



**Célia Sofia Ramalho  
Ferreira**

**Carga viral do Vírus da Hepatite B por PCR-RT em  
Plasma *versus* Soro**



**Célia Sofia Ramalho  
Ferreira**

**Carga viral do Vírus da Hepatite B por PCR-RT  
em Plasma *versus* Soro**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação da Dr.<sup>a</sup> Celene Sargento, responsável pelo Sector de Biologia Molecular do Serviço de Sangue e Medicina Transfusional dos Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE e da Prof.<sup>a</sup> Doutora Conceição Santos do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho ao Jorge e à Laurita pelo apoio, paciência e compreensão incondicionais em mais uma fase da minha vida académica.

*In memoriam*

À minha mãe... por tudo.



## **o júri**

presidente

**Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria Helena Abreu Silva**

Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

arguente

**Dr.<sup>a</sup> Olga Maria Curto Pereira**

Assessora Superior, especialista em Análises Clínicas, responsável pelo sector de Endocrinologia e gestora da qualidade no Laboratório de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Cova da Beira

orientadora

**Dr.<sup>a</sup> Maria Celene da Silva Sousa Sargento**

Assessora Superior, especialista em Análises Clínicas e responsável pelo sector de Biologia Molecular do Serviço de Sangue e Medicina Transfusional dos Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE

orientadora

**Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos**

Professora com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,  
nunca tem medo e nunca se arrepende."

Leonardo da Vinci

## **agradecimentos**

Quero expressar um agradecimento especial à Dr.<sup>a</sup> Celene Sargento, pela amizade, pelo apoio, orientação, conhecimento e espírito científico transmitidos, que permitiram o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Doutora Conceição Santos, pela força, carinho, dedicação, disponibilidade e colaboração prestadas ao longo deste trabalho.

Às minhas colegas do Sector de Biologia Molecular, Ana Margarida Almeida e Emília Silva, outro agradecimento especial pelo incondicional apoio, incansável empenho, dedicação e amizade para que este trabalho tivesse viabilidade.

Ao Mestre João Paulo Figueiredo, docente da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra pela disponibilidade e colaboração preciosa prestada no tratamento estatístico deste trabalho.

À Directora do Serviço de Sangue e Medicina Transfusional, dos Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE, Dr.<sup>a</sup> Paula Seça, por ter autorizado o trabalho e pela colaboração prestada durante este meu percurso académico.

À Universidade de Aveiro e ao Departamento de Biologia pela oportunidade, pelo conhecimento, pela simpatia e pelo elevado humanismo institucional que transmite.

Aos colegas e amigos pela amizade e que de uma forma ou outra contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e me deram palavras de incentivo.

À minha família pelo carinho, apoio, ânimo e palavras de amizade ao longo desta jornada e de toda a minha vida.

## palavras-chave

VHB, carga viral, PCR-RT, Cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan®, plasma, soro

## resumo

A infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) constitui um grave problema para a saúde pública, calculando-se que mais de 2 bilhões de pessoas foram infectadas e mais de 350 milhões de pessoas no mundo sejam doentes crónicos infectados pelo VHB, dos quais 20 a 30 % estão em risco de morrer de carcinoma hepatocelular ou de outros problemas hepáticos.

A variabilidade genética do VHB reflecte-se nos diferentes genótipos, sendo conhecidos actualmente 8 genótipos diferentes denominados pelas letras de A a H.

O conhecimento do significado clínico dos diferentes genótipos em doentes com ambas as infecções do VHB (aguda e crónica) foi aumentando ao longo dos anos.

A introdução de técnicas baseadas em biologia molecular deu-nos uma ferramenta preciosa no manejo de hepatites virais, uma vez que podem ser usadas para confirmar o diagnóstico de infecção activa. Estas técnicas ajudam ainda a estabelecer um prognóstico, a seleccionar e ajustar protocolos de tratamento e avaliam a resposta viral à terapêutica, incluindo o desenvolvimento de resistências.

O DNA do VHB pode ser detectado e quantificado através de tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos como é o caso da Reacção em Cadeia da Polimerase em tempo real (PCR-RT). Esta técnica é bastante recomendada para a monitorização da hepatite B, pela sua sensibilidade, precisão e limites dinâmicos máximos, quando comparada com outros testes comerciais.

O teste Cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan® HBV (Roche Diagnostics) é um teste comercial de amplificação de ácidos nucleicos para a determinação da virémia baseado na química do PCR TaqMan. Este teste foi recentemente desenvolvido para poder ser usado com o protocolo do Cobas AmpliPrep (equipamento automático de extracção de DNAs ou RNAs de produtos biológicos, tal como soro e plasma).

Uma vez que o teste Cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan® HBV foi validado apenas para utilização de plasma humano colhido com EDTA, pretende-se com este estudo comparar a carga viral do DNA do VHB, por PCR-RT em amostras de plasma e soro. Esta comparação permitirá a validação interna dos resultados em amostras de soro. Para esta validação usaram-se amostras de 360 indivíduos com infecção pelo VHB aguda ou crónica, activa ou não. Os resultados obtidos mostram que existe uma boa correlação entre as cargas virais do plasma e as cargas virais do soro, sendo uma relação estatisticamente significativa entre as duas variáveis ( $p < 0,05$ ), pelo que se pode validar o uso do teste Cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan® HBV em soro. Conclui-se assim que o teste foi validado para amostras de soro.

## keywords

HBV, viral load, RT-PCR, Cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan®, plasma, serum

## abstract

Hepatitis B virus (HBV) infection is a serious public health problem. Estimations indicate that more than 2 billion people had been infected and more than 350 million people in the world are chronically infected with HBV, 20 to 30% which are at risk of dying of hepatocellular carcinoma or other hepatic related problems.

The HBV genetic variability is reflected on different genotypes, being currently known 8 different genotypes named by the letters A- H. The knowledge of clinical meaning of different genotypes in sick people with both the infections of the HBV (acute and chronic) was increasing throughout the years.

The employment of techniques based on molecular biology gave us a precious tool to handling viral hepatitis. They can be used to diagnosis active infection, help to establish a prognostic, to select and to adjust treatment protocols and evaluate the viral response to therapeutic, including resistances development.

HBV DNA can be detected and quantified through nucleic acids amplification technologies such real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Follow-up using RT-PCR is strongly recommended because of its sensitivity, accuracy and broad dynamic range, compared to those of the existing commercial assays.

The Cobas® TaqMan® HBV test (Roche Diagnostics) is a commercial nucleic acid amplification test for HBV DNA viral load determination based on TaqMan PCR chemistry and recently it had been combined with an automatic DNA or RNA extraction on the Cobas® AmpliPrep, a new instrument designed for rapid high-throughput purification of DNAs and RNAs from biologic products (such serum and plasma).

Because Cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan® HBV test was validated only for human plasma collected in EDTA, the aim of this study is to compare the PCR-RT viral load of HBV DNA in samples of plasma and serum, with the purpose of internal validation results on serum samples.

This comparison will allow internal validation of results on serum samples. For this validation we used samples of 360 patients with acute or chronic HBV infection, active or not. The results show that there is a good correlation between the plasma viral loads and serum viral loads, being a statistically significant relationship between the two variables ( $p < 0.05$ ), can validate using Cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan® HBV test in serum. In conclusion, the test was validated on serum samples.

# ÍNDICE

<b>Lista de Abreviaturas .....</b>	<b>13</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>15</b>
<b>Lista de Tabelas.....</b>	<b>16</b>
<b>Lista de Gráficos.....</b>	<b>17</b>
 <b>Capítulo I</b>	
1. Introdução .....	19
1.1. Enquadramento histórico da Hepatite B .....	19
1.2. O vírus da Hepatite B .....	20
1.3. Organização genómica .....	21
1.4. Variabilidade genética .....	23
1.4.1. Genótipos e serotipos .....	23
1.4.2. Variantes e mutantes do VHB.....	25
1.5. Ciclo de replicação viral.....	26
1.6. Epidemiologia.....	28
1.7. Vias de Transmissão .....	29
1.8. Evolução da infecção pelo VHB.....	30
1.8.1. Hepatite Aguda .....	30
1.8.2. Hepatite Fulminante .....	31
1.8.3. Hepatite Crónica.....	32
1.9. Prevenção.....	34
1.10. Tratamento.....	35
1.10.1. Hepatite Aguda.....	35
1.10.2. Hepatite crónica.....	35
1.11. Diagnóstico Laboratorial.....	38
1.12. Os testes laboratoriais .....	39

1.12.1. Estudo serológico do VHB .....	39
1.12.2. Estudo molecular do DNA do VHB .....	40
<b>Capítulo II</b>	
2. Justificação e objectivos do estudo .....	51
2.1. Justificação do estudo .....	51
2.2. Objectivos .....	52
<b>Capítulo III</b>	
3. Material e métodos .....	54
3.1. Local do Estudo .....	54
3.2. Tipo de Estudo .....	54
3.3. Técnica de amostragem e dimensão da amostra .....	54
3.4. Metodologia .....	55
3.4.1. Procedimento .....	55
3.4.1.1. Princípio .....	55
3.4.1.2. Equipamentos .....	56
3.4.1.3. Materiais e Reagentes .....	56
3.4.1.4. Preparação da Amostra .....	58
3.4.1.5. Modo Operatório .....	59
3.4.2. Cálculo e Expressão dos Resultados .....	63
3.5. Tratamento Estatístico de Dados .....	65
<b>Capítulo IV</b>	
4. Resultados .....	67
4.1. Resultados obtidos para a totalidade de cargas virais de plasma e soro .....	67
4.2. Resultados obtidos para cargas virais de plasma e soro no grupo “0 log” .....	68
4.3. Resultados obtidos para cargas virais de plasma e soro no grupo 1 log .....	69
4.4. Resultados obtidos para cargas virais de plasma e soro no grupo 2 log .....	70

4.5. Resultados obtidos para cargas virais de plasma e soro no grupo 3 log .....	71
4.6. Resultados obtidos para cargas virais de plasma e soro no grupo 4 log .....	72
4.7. Resultados obtidos para cargas virais de plasma e soro no grupo 5 log .....	73
4.8. Resultados obtidos para cargas virais de plasma e soro no grupo 6 log .....	74
4.9. Resultados obtidos para cargas virais de plasma e soro no grupo 7 log .....	75
4.10. Resultados totais obtidos para cargas virais de plasma e soro .....	76
4.11. Resultados obtidos para cargas virais de plasma e soro em função do sexo .....	76
4.12. Resultados obtidos para cargas virais de plasma e soro em função da idade .....	77
4.13. Resultados obtidos para cargas virais de plasma e de soro em amostras positivas para HCV e/ou HIV (especificidade do teste) .....	78
4.14. Resultados obtidos para réplicas de cargas virais de soro .....	80
4.15. Resultados obtidos para estabilidade da carga viral após 2 ciclos de Congelamento-Descongelamento .....	81
<b>Capítulo V</b>	
5. Discussão .....	83
<b>Capítulo VI</b>	
6. Conclusão .....	86
<b>Capítulo VII</b>	
7. Referências Bibliográficas .....	88
<b>Anexos</b>	
ANEXO 1: Bula do teste Cobas® Ampliprep/Cobas® TaqMan® HBV .....	95
ANEXO 2: Folha de resultados da carga viral do VHB por PCR-RT do teste Cobas Ampliprep / Cobas TaqMan HBV .....	103
ANEXO 3: Folha pormenorizada do resultado de uma amostra (com visualização da curva de amplificação) por PCR-RT do teste Cobas Ampliprep/Cobas TaqMan HBV .....	104
ANEXO 4: Folha de dados Excel com os Resultados obtidos (UI/ml) das cargas virais do plasma e do soro conjugados com outros dados: Sexo, Ano de Nascimento, Idade e HCV/HIV. As cargas virais estão divididas por grupos de logs, diferenciados pelas cores .....	105
ANEXO 5: Resultados obtidos (UI/ml) das cargas virais nas réplicas de soro .....	113



## Lista de Abreviaturas

<b>Ac</b>	Anticorpo
<b>Ag</b>	Antigénio
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>Au</b>	Antigénio Austrália
<b>cccDNA</b>	“covalently closed circular” DNA
<b>C-D</b>	Congelamento-Descongelação
<b>CDC</b>	“Center for Disease Control and Prevention” (EUA)
<b>CHC</b>	Carcinoma hepatocelular
<b>Ct</b>	ciclo-“threshold”
<b>CTM (-) C</b>	Controlo negativo do VHB
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTPs</b>	desoxinucleótidos
<b>DP</b>	Desvio-padrão
<b>EASL</b>	“European Association for the Study of the Liver”
<b>EIA</b>	enzima- imuno ensaio
<b>ELISA</b>	“enzyme-linked immunosorbent assay”
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetra-acético
<b>EPE</b>	Entidade Pública Empresarial
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FDA</b>	“Food and Drug Administration”
<b>HBC</b>	Hepatite B crónica
<b>HBcAc</b>	Anticorpo do core da Hepatite B
<b>HBcAc IgM</b>	Anticorpo do core da Hepatite B tipo IgM
<b>HBcAg</b>	Antigénio do core da Hepatite B
<b>HBeAc</b>	Anticorpo e precoce (“early”) da Hepatite B
<b>HBeAg</b>	Antigénio e precoce (“early”) da Hepatite B
<b>HBsAc</b>	Anticorpo de superfície da Hepatite B
<b>HBsAg</b>	Antigénio de superfície da Hepatitis B
<b>HBV</b>	Vírus da Hepatite B
<b>HBV L(+)C</b>	Controlo positivo baixo (“low”) do VHB
<b>HBV H(+)C</b>	Controlo positivo alto (“high”) do VHB
<b>HTLV I/II</b>	Vírus Linfotrópico Humano tipo I/II
<b>HUC</b>	Hospitais da Universidade de Coimbra

<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>MEIA</b>	Ensaio imunoenzimático em micropartículas
<b>NAT</b>	Testes de Ácidos Nucleicos
<b>ICH</b>	“International Conference on Harmonization”
<b>NUCs</b>	nucleósídeos análogos/análogos de nucleotídeos
<b>MSD</b>	Merck Sharp & Dohme
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>ORF</b>	“Open reading frames”
<b>PCR</b>	Reacção em cadeia da polimerase
<b>PCR–RT</b>	Reacção em cadeia da polimerase em tempo real
<b>PQ</b>	Padrão de quantificação
<b>QS</b>	Padrão de quantificação
<b>RFLP</b>	“Restriction fragment lenght polymorfism”
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>SWGDAM</b>	“Scientific Working Group on DNA Analysis Methods”
<b>UI</b>	Unidades Internacionais
<b>VHB</b>	Vírus da Hepatite B
<b>VHC</b>	Vírus da Hepatite C
<b>VHD</b>	Vírus da Hepatite Delta
<b>VIH</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>WHO</b>	“World Health Organization”

## Lista de Figuras

- Figura 1:** Imagem de M.E. de partículas de VHB (x 200 000) mostrando as partículas de Dane (completas) com 42 nm, partículas filamentosas de 22 nm e pequenas partículas esféricas vazias de 22 (Thomas, 2005)
- Figura 2:** Representação esquemática dos três tipos de partículas do VHB (adaptada de <http://pathmicro.med.sc.edu/virol/hepatitis-virus>)
- Figura 3:** Esquema da Estrutura do VHB (adaptada de J.A. Perkins, retirada de <http://people.rit.edu/japfaa/HBV.jpgn>)
- Figura 4:** Representação esquemática do genoma do VHB, com as quatro cadeias de leitura aberta (ORF), ou genes pré-S/S, Pré-C/C, gene P e gene X (adaptada de Kidd-Ljunggren, 2002)
- Figura 5:** Representação esquemática dos genótipos do VHB e sua relação filogenética em árvore (adaptada de Kramvis et al., 2005)
- Figura 6:** Locais de ocorrência de mutações no VHB (adaptada de Sherlock et al., 2002)
- Figura 7:** Ciclo de replicação do VHB (adaptada de Murray et al., 2005)
- Figura 8:** Prevalência mundial dos portadores crônicos de hepatite B e do carcinoma hepatocelular primário (imagem do CDC, adaptada de Murray et al., 2005)
- Figura 9:** Evolução da infecção aguda pelo VHB com recuperação (adaptada de [medpediamedia.com/.../HBV\\_serum\\_markers.png](http://medpediamedia.com/.../HBV_serum_markers.png))
- Figura 10:** Quadros clínicos da infecção aguda pelo VHB (adaptado de Murray et al., 2005)
- Figura 11:** Evolução típica da infecção crônica pelo VHB (adaptado de Engleberg, et. al., 2007)
- Figura 12:** Etapas do processo da PCR (adaptada de <http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=339>)
- Figura 13:** Ciclos da PCR (adaptada de <http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=339>)
- Figura 14:** PCR tradicional versus PCR em tempo real (imagem adaptada de [http://www.ibb.unesp.br/extensao/acidos\\_nucleicos/material\\_didatico](http://www.ibb.unesp.br/extensao/acidos_nucleicos/material_didatico))
- Figura 15:** Comparação de alguns testes de PCR para o DNA do VHB: o teste Cobas TaqMam 48 HBV por PCR-RT, distinguindo-se bem a sensibilidade acrescida deste (<10 UI/ml) em relação aos restantes testes, nomeadamente o Versant HBV DNA 3.0 (b-DNA) que tem um limite de detecção de entre 10<sup>2</sup> e 10<sup>3</sup>UI/ml (imagem adaptada de EASL, 2003)
- Figura 16:** Gráfico de PCR-RT com visualização da linha do “threshold”, do Ct e da fluorescência emitida ao longo dos ciclos (imagem adaptada de [http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr\\_vs\\_tradpcr.pdf](http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr_vs_tradpcr.pdf))
- Figura 17:** Princípio do teste TaqMan do Cobas TaqMan (adaptada de <http://www.scribd.com/doc/2075721/Cobas-TaqMan-48>)
- Figura 18:** a) Cobas AmpliPrep; b) Cobas TaqMan; c) Kit para teste Cobas AmpliPrep /TaqMan HBV da Roche Diagnostics (adaptada de [www.scribd.com/doc/2075721/Cobas-TaqMan-48](http://www.scribd.com/doc/2075721/Cobas-TaqMan-48))

## Lista de Tabelas

- Tabela 1:** Distribuição dos subtipos (serotipos) nos genótipos do VHB (imagem modificada de Kramvis et al., 2005)
- Tabela 2:** Marcadores serológicos/virológicos da infecção pelo VHB (adaptado de Abbott, 1994; Areias, 1997; Macedo e Marinho, 2009)
- Tabela 3:** Interpretação dos marcadores do VHB no diagnóstico da hepatite B (adaptado de Fonseca, 2007; Zuckerman et al., 2009; [www.hepcentro.com.br/hepatite\\_b.htm](http://www.hepcentro.com.br/hepatite_b.htm))
- Tabela 4:** Características e comparação de alguns testes de PCR para o DNA do VHB : o teste Versant® HBV DNA 3.0 por b-DNA, o teste Cobas® TaqMan® 48 HBV por PCR-RT, e a 2ª versão deste.
- Tabela 5:** Interpretação dos resultados obtidos por PCR-RT no Cobas® TaqMan®
- Tabela 6:** Coeficiente de Pearson entre a totalidade das cargas virais do plasma e do soro
- Tabela 7:** Coeficiente de Pearson entre as cargas virais do plasma e do soro no grupo “0 log”
- Tabela 8:** Coeficiente de Pearson entre as cargas virais do plasma e do soro no grupo 1log
- Tabela 9:** Coeficiente de Pearson entre as cargas virais do plasma e do soro no 2 log
- Tabela 10:** Coeficiente de Pearson entre as cargas virais do plasma e do soro no grupo 3 log
- Tabela 11:** Coeficiente de Pearson entre as cargas virais do plasma e do soro no grupo 4 log
- Tabela 12:** Coeficiente de Pearson entre as cargas virais do plasma e do soro no grupo 5 log
- Tabela 13:** Coeficiente de Pearson entre as cargas virais do plasma e do soro no grupo 6 log
- Tabela 14:** Coeficiente de Pearson entre as cargas virais do plasma e do soro no grupo 7 log
- Tabela 15:** Coeficiente de relação intraclassas entre as cargas virais do plasma e do soro
- Tabela 16:** Análise das cargas virais de plasma e de soro em função do sexo dos indivíduos
- Tabela 17:** Análise das cargas virais de plasma e de soro em função do sexo dos indivíduos pelo teste T de student
- Tabela 18:** Análise das cargas virais de plasma e de soro em função da idade dos indivíduos
- Tabela 19:** Análise das cargas virais de plasma e de soro em função da hepatite C
- Tabela 20:** Análise das cargas virais de plasma e de soro em função da hepatite C
- Tabela 21:** Análise dos casos de HVC e HIV positivos e negativos por “Cross-tabulation”
- Tabela 22:** Análise dos casos de HVC e HIV positivos e negativos pelo teste Qui- quadrado independente com aplicação do teste exacto de Fisher
- Tabela 23:** Análise das médias das cargas virais das réplicas de soro sem diluição (1/1) e com diluição (1/2)
- Tabela 24:** Análise da correlação das réplicas de sem (1/1) e com e diluição (1/2)
- Tabela 25:** Características e comparação de alguns testes de PCR para o DNA do VHB, agora com a nossa validação para o soro no teste Cobas® TaqMan® 48 HBV por PCR-RT

## Lista de Gráficos

- Gráfico 1:** Correlação entre as cargas virais da totalidade das amostras de plasma e de soro
- Gráfico 2:** Correlação entre as amostras de plasma e de soro no grupo 1 log
- Gráfico 3:** Correlação entre as amostras de plasma e de soro no grupo 2 log
- Gráfico 4:** Correlação entre as amostras de plasma e de soro no grupo 3 log
- Gráfico 5:** Correlação entre as amostras de plasma e de soro no grupo 4 log
- Gráfico 6:** Correlação entre as amostras de plasma e de soro no grupo 5 log
- Gráfico 7:** Correlação entre as amostras de plasma e de soro no grupo 6 log
- Gráfico 8:** Gráfico 8 - Estabilidade da carga viral (UI/ml) do VHB de 3 amostras (459308, 460070 e 460642) em plasma (P) e soro (S), após um máximo de 2 ciclos de Congelamento - Descongelamento (C-D).

## **CAPÍTULO I**

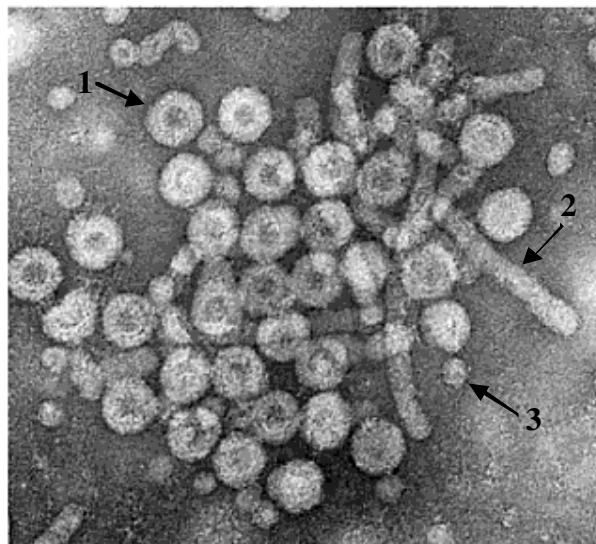
# I - Introdução

## 1.1. Enquadramento histórico da Hepatite B

A hepatite é conhecida há séculos, referida durante anos como uma inflamação do fígado. A descrição de icterícia, i.e., hepatite, data de antigos manuscritos chineses, e a primeira referência europeia data do século III D.C. Também ficaram gravados na História, focos de epidemia de icterícia ou hepatite, nomeadamente entre as tropas de Napoleão, no início do século XIX (Specter, 1999; Shors, 2008).

Todavia, o reconhecimento de determinadas formas de hepatite como uma doença infecciosa aparece apenas no início do século passado (Cockayne, 1912; Specter, 1999). Na década de 1940, os médicos começaram a perceber que existiam vírus responsáveis por hepatite infecciosa (Specter, 1999).

Em 1965, Blumberg e seus colaboradores descobriram que alguns pacientes hemofílicos, politransfundidos, possuíam anticorpos que reagiam com partículas antigénicas oriundas de um aborígene australiano. Mais tarde foi identificado o mesmo antigénio em pacientes com hepatite, que haviam recebido transfusão sanguínea, surgindo assim uma correlação etiológica (Blumberg et al., 1965; Colacino e Heinz, 2004; Zuckerman et al., 2009; [pt.wikipedia.org/wiki/hepatite\\_B](http://pt.wikipedia.org/wiki/hepatite_B)).



**Fig 1: Imagem de M.E. de partículas do VHB (x 200 000): 1-partículas de Dane (completas) com 42 nm, 2 - partículas filamentosas de 22 nm e 3 - pequenas partículas esféricas vazias de 22 nm (adaptada de Thomas et al., 2005)**

O antígeno de superfície da Hepatite B (HBsAg), estrutura que constitui o envoltório do VHB foi na altura chamado de Antígeno Austrália (Au), por ter sido identificado no aborígine australiano (Blumberg et al., 1965; Colacino e Heinz, 2004).

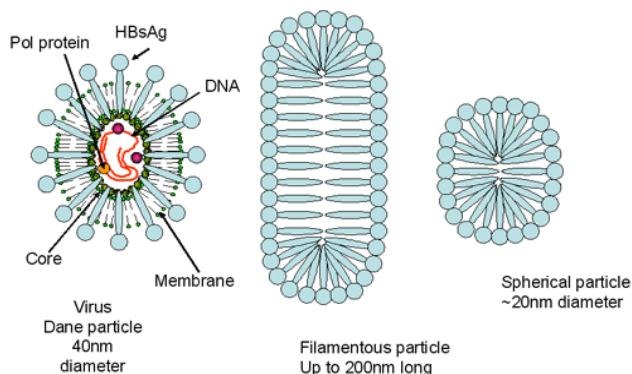
Contudo, a prova de que este vírus é responsável por hepatites clínicas, foi pela primeira vez publicada em 1968, também por estes investigadores, na Nature, com a descrição de partículas do VHB (Blumberg et al, 1968).

No ano de 1970 Dane com a ajuda dos seus colaboradores identificaram o vírus completo da Hepatite B, a partir da análise do sangue de indivíduos infectados, e logo em 1973 Kaplan detectou um DNA endógeno dependente de uma DNA polimerase encontrada no interior das partículas, confirmando assim a sua natureza viral. A partir desses dados Robinson caracterizou o genoma do VHB em 1974 (Mendes e Pittella, 1994).

A clonagem do DNA do VHB e a sequenciação completa do seu genoma, em 1979, abriu novos horizontes para compreender melhor a biologia do VHB e a sua história natural (Specter, 1999).

## 1.2. O Vírus da Hepatite B

O HBsAg foi descrito pela primeira vez por Blumberg et al. (1965), como Antígeno Australia. Quando o soro de indivíduos infectados pelo Antígeno Australia foi estudado por microscopia electrónica, observaram um vasto número de esferas com cerca de 22 nm de diâmetro e de filamentos com mais de 200 nm de comprimento, mas também observaram partículas com cerca de 42 nm de diâmetro com uma nucleocápside central e um invólucro exterior (Dane et al., 1970; Figs.1, 2).

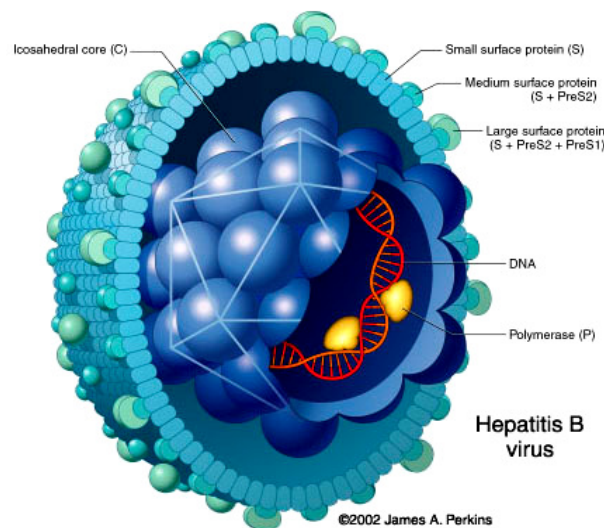


**Fig 2: Representação esquemática dos três tipos de partículas do VHB** ( adaptada de

<http://pathmicro.med.sc.edu/virol/hepatitis-virus>).



O VHB completo, também chamado partícula de Dane, é uma estrutura esférica de camada dupla, com cerca de 42 nm de diâmetro. Contém um revestimento externo composto maioritariamente por uma proteína designada antígeno de superfície (AgHBs) e um invólucro interno que é constituído pela proteína do core (AgHBc). Este é constituído por um invólucro proteico, a nucleocápside, que contém no seu interior o DNA e uma DNA polimerase (P) que tem actividade de transcriptase reversa e de ribonuclease H, sendo importante para a replicação do vírus. O antígeno precoce “e”, AgHBe é outra das proteínas do invólucro interno, embora algumas estirpes, designadas por mutantes, consigam reproduzir-se sem produzir o AgHBe (Seeger et al., 2000; Figs. 2, 3).

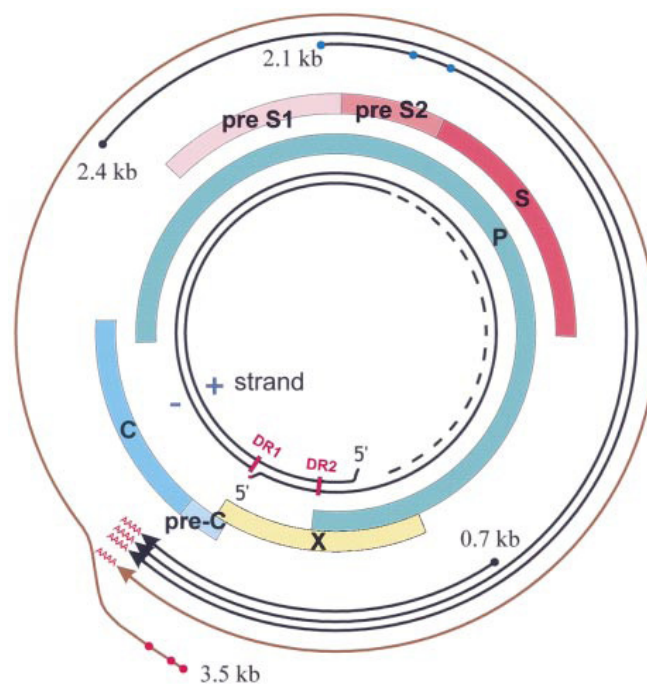


**Fig 3: Esquema da Estrutura do VHB** (adaptado de J. A. Perkins, retirado de <http://people.rit.edu/japfaa/HBV.jpgn>)

### 1.3. Organização genómica

O genoma do VHB, com 3182 nucleótidos e de estrutura pouco comum, é constituído por uma molécula de DNA com duas cadeias lineares de configuração circular por emparelhamento de bases nas extremidades 5': uma completa (cadeia -) e outra parcialmente incompleta (cadeia +). Esta última está associada à molécula de DNA polimerase, na extremidade 3', que é capaz de completar a cadeia quando lhe são fornecidos desoxinucleótidos trifostados (Baron, 1996; Block et al., 2007)

Nesta cadeia + existem 4 cadeias de leitura aberta (ORF, “open reading frames”). Uma delas é cadeia de leitura pré-S/S e pode iniciar-se em 3 códons distintos AUG de iniciação, produzindo 3 proteínas: a pré-S1 que está envolvida no reconhecimento do VHB pelos receptores do hepatócito, a pré-S2 e pequeno S que codifica as 3 glicoproteínas de superfície (HBsAg): a L (grande, “large”) de 42 kD, M (média, “medium”) de 31 kD, e a S (pequena, “small”) de 27 kD, todas presentes nas partículas víricas infecciosas (Block et al., 2007).



**Fig 4: Representação esquemática do genoma do VHB, com as quatro cadeias de leitura aberta (ORF), ou genes pré-S/S, Pré-C/C, gene P e gene X (adaptada de Kidd-Ljunggren et al., 2002)**

A região ORF do gene pré-C/C controla a síntese das proteínas da nucleocápside, o HBcAg e o HBeAg e o gene P codifica a DNA polimerase/transcriptase reversa.

A quarta ORF foi designada de X, porque a função do produto deste pequeno gene era desconhecida. Contudo, já se demonstrou que esta ORF é um potente transativador transcripcional, parecendo ter uma função essencial na replicação e por activar a cinase src que poderá estar na base da hepatocarcinogénese (Baron, 1996; Block et al., 2007). Esta proteína pode também interagir com p53, um dos genes da célula supressora de tumor (Block et al., 2007; <http://pathmicro.med.sc.edu/virol/hepatitis-virus.htm>).

## 1.4. Variabilidade genética

### 1.4.1. Genótipos e serotipos

A variabilidade genética do VHB reflecte-se nos diferentes genótipos, conhecendo-se actualmente 8 genótipos denominados pelas letras de A – H (A, B, C, D, E, F, G, H). Estes genótipos diferenciam-se uns dos outros pela divergência de pelo menos 8% na sequência completa do genoma viral (Okamoto et al., 1988; Norder et al., 1992b; Arauz-Ruiz et al., 2002; Kidd-Ljunggren et al., 2002).

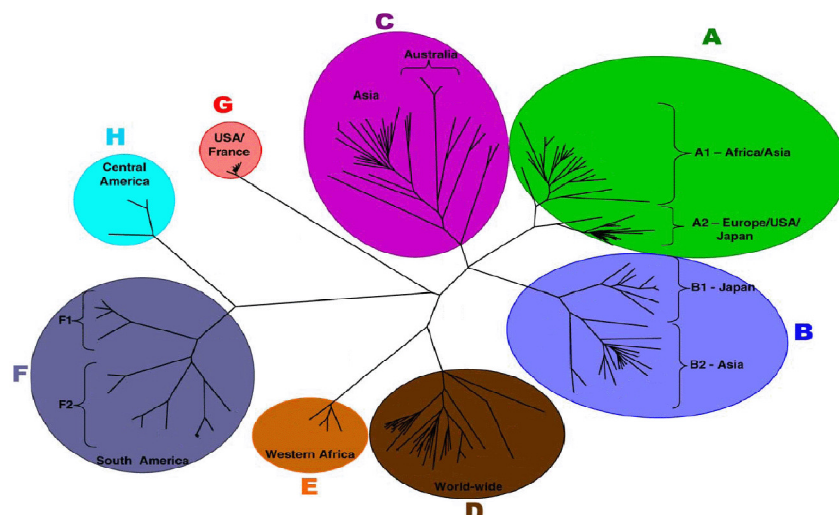
**Tabela 1: Distribuição dos subtipos (serotipos) nos genótipos do VHB** (adaptada de Kramvis et al., 2005).

Genotype	Predominant subtype	Genome length (bp)	ORF-differences	Length of polymerase
A	adw2 (ayw1)	3221	Insertion of aa 153 and 154 in HBc	845 aa
B	adw2 (ayw1)	3215		843 aa
C	adr and ayr	3215		843 aa
D	ayw1,2,3	3182	Deletion of aa 1–11 in preS1	832 aa
E	ayw4 (adw2)	3212	Deletion of aa 11 in preS1	842 aa
F	adw4	3215		843 aa
G	adw2	3248	Insertion of 12 aa in HBc deletion of aa 11 in preS1	842 aa
H	adw4	3215		843 aa

As glicoproteínas do HBsAg contêm determinantes específicos de grupo (denominados a) e determinantes específicos do tipo de VHB (denominados d / y / w / r). A combinação destes antígenos (e.g. ady, adw) dá lugar a subtipos (serotipos) do VHB que constituem marcadores epidemiológicos bastante úteis (Simão e Santos, 1994; Murray, 2003; Levinson, 2006). Por exemplo, os genótipos A (serotipo adw) e D (ayw) são comuns nos Estados Unidos da América (EUA) e Europa. Os genótipos B (adw) e C (adr) são mais frequentes na China e Sudeste Asiático ([http://www.aidsportugal.com/hepatites/46\\_91.pdf](http://www.aidsportugal.com/hepatites/46_91.pdf)).

Inicialmente foram identificados quatro subtipos (ayw, adr, ayr e adw), tendo depois sido expandidos com a identificação de mais sub-determinantes dentro do HBsAg (Kramvis et al., 2005).

A tabela 1 apresenta a distribuição predominante de serotipos dentro dos genótipos HBV e as diferenças causadas ao nível da ORF da polimerase do VHB.



**Fig 5: Representação esquemática dos genótipos do VHB e sua relação filogenética em árvore** (adaptada de Kramvis et al., 2005).

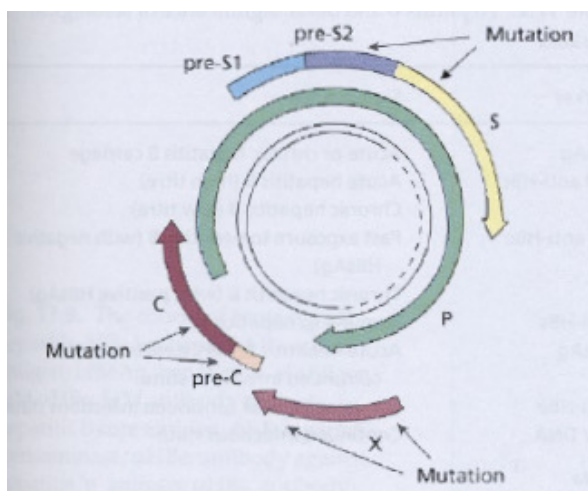
A distribuição dos genótipos pelo mundo encontra-se descrita na figura 5: genótipo A na Ásia, Japão, África, Europa e EUA; genótipo B na Ásia e Japão; genótipo C na Ásia e Austrália; genótipo D em todo o mundo; genótipo E na África Ocidental; genótipo F na América do Sul; genótipo G nos EUA e França e, o último genótipo a ser descrito: o H na América Central (Kidd-Ljunggren et al., 2002; Kramvis et al., 2005).

O conhecimento do significado clínico dos diferentes genótipos em doentes com ambas as infecções do VHB (aguda e crónica) foi aumentando ao longo dos anos. Alguns estudos sugerem que os genótipos do VHB podem influenciar a gravidade da doença e a resposta ao tratamento (Akuta et al., 2004; Chen, 2004).

O genótipo B está associado a altas taxas de seroconversão do HBeAg para anti-HBe quando comparado com o genótipo C. A selecção da mutação pré-core (anti-HBe reactivo) é relatada entre portadores do genótipo B, a variante pré-core é mais comum em pacientes com genótipo D e raramente entre os que apresentam genótipo A. Portadores do VHB mutante pré-core (hepatite crónica B, HBeAg negativo) com genótipo D apresentam resistência significativa à lamivudina (Osiony, 2003; Hideaki et al., 2004; Kidd-Ljunggren et al., 2004).

### 1.4.2. Mutantes e variantes do VHB

As variações ou mutações na sequência de nucleótidos do VHB têm consequências clínicas e virológicas importantes. O vírus existe geralmente na sua forma “selvagem”. Os doentes assim infectados designam-se como tendo hepatite B crónica AgHBe positivo, contudo poderão ocorrer mutações (Fig. 6), caracterizadas pela mudança definitiva e permanente do código genético do VHB que podem surgir de duas formas: a) espontânea, aquando da replicação natural ou por pressão imunitária do hospedeiro; b) em resposta à terapêutica antivírica (Macedo e Marinho, 2009).



**Fig 6: Locais de ocorrência de mutações no VHB** (adaptada de Sherlock et al., 2002).

Assim, os doentes com hepatite B, AgHBe negativo têm sobretudo uma população vírica predominante de mutantes do pré-core ou do promotor do core, que supostamente evitam ou reduzem a produção regular do AgHBe, pelo que uma serologia HBeAg negativa / anti-HBe positiva poderá estar associada a hepatite em actividade e não em resolução ([http://www.hepcentro.com.br/hepatite\\_b.htm](http://www.hepcentro.com.br/hepatite_b.htm)).

Este tipo de hepatite B crónica, provocada pelos vírus mutantes do pré-core, é muito prevalente na Europa meridional, tal como em Portugal (80% das hepatites crónicas) e apresenta uma taxa muito escassa de resolução espontânea (Macedo e Marinho, 2009).

Está ainda descrito que a pressão selectiva na vacinação para a hepatite B pode causar mutações no HBsAg que escapam à neutralização pelos anticorpos induzidos daquela vacina (Wilson et al., 1999; Gerlich, 2006).

O tratamento da hepatite B pode promover o aparecimento de *quasispecies* (Kramvis, et al., 2005), pelo que têm sido encontradas mutações no gene da polimerase em doentes, a fazer terapêutica antivírica, que vêm a desenvolver resistências a estes fármacos. Os mutantes da polimerase melhor caracterizados são os que ocorrem no decurso da terapêutica com lamivudina. Estas mutações são causadas por substituições de aminoácidos tirosina-metionina-aspartato-aspartato (YMDD), modificando assim o domínio catalítico "YMDD" da DNA polimerase, conferindo resistência à lamivudina e a outros nucleosídeos relacionados (Lok, 2001; Hatakeiama et al., 2007; [http://www.aidsportugal.com/hepatites/46\\_91.pdf](http://www.aidsportugal.com/hepatites/46_91.pdf)).

As mutações "YMDD" são então aquelas que ocorrem numa região específica da polimerase do DNA e que torna a enzima resistente ou menos vulnerável aos efeitos de vários fármacos antivirais. Elas surgem no decurso do tratamento com alguns desses agentes e constituem actualmente o grande problema no tratamento desta infecção (Macedo e Marinho, 2009).

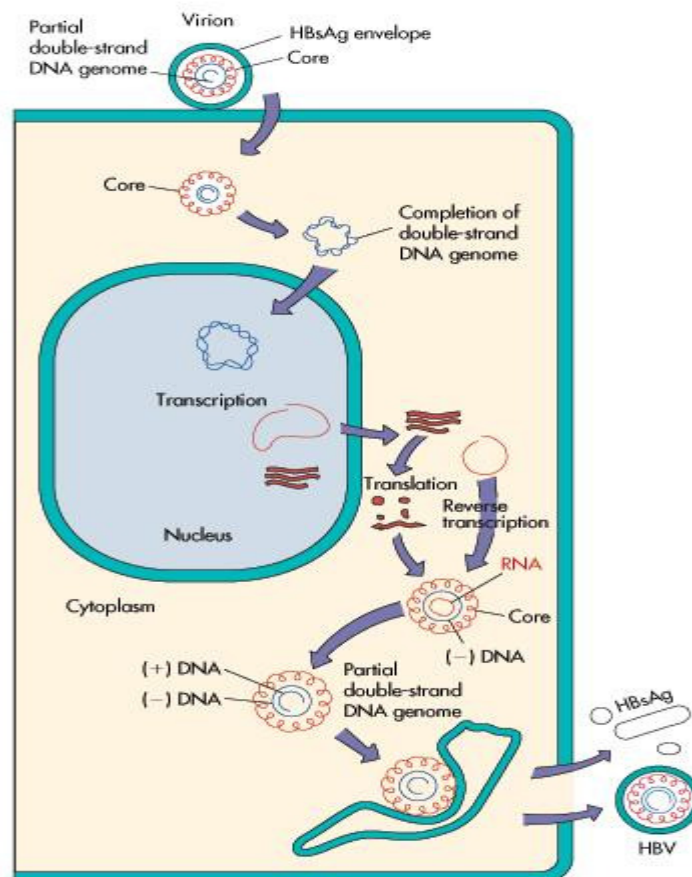
### **1.5. Ciclo de Replicação Viral**

O VHB tem tropismo preferencial pelo hepatócito, classificando-se actualmente como protótipo de um vírus pertencente à família *Hepadnaviridae* (White e Fenner, 1994; Kidd-Ljunggren et al., 2002).

O vírus da hepatite B, tal como todos os vírus, tem que primeiramente infectar uma célula capaz de suportar a sua replicação. Embora as células hepáticas sejam as mais efectivas para a replicação do VHB, existem outros locais, extra-hepáticos (como rins, pâncreas e células mononucleares) que também conseguem suportar a replicação, mas a um nível mais baixo (Kidd-Ljunggren et al., 2002).

A aderência do VHB aos hepatócitos está mediada pelas glicoproteínas do HBsAg, que apesar de se desconhecer o receptor no hepatócito e o mecanismo de entrada, sabe-se que o HBsAg se une à albumina sérica humana polimerizada e a outras proteínas do soro (Murray et al., 2005). Após ligação ao receptor na membrana do hepatócito, o core do VHB passa primeiro para o citoplasma e depois para o núcleo onde se sintetiza então DNA para completar o genoma circular do vírus. O genoma vírico é, assim, convertido numa cadeia circular fechada de DNA com ligações covalentes (DNAccc) pela DNA polimerase vírica. (Beck e Nassal, 2007). A partir da cadeia de DNAccc, são transcritos pela RNA

polimerase, classes de RNAm: três principais (2100, 2400 e 3500 bases) e duas classes secundárias (900 bases). O RNAm de 3500 bases é maior que o próprio genoma do VHB e codifica os antígenos HBe e HBc, a polimerase e um iniciador de proteína para a replicação do DNA que também servirá de padrão para a replicação do genoma. No citoplasma, o RNA da nucleocápside vai servir de molde para a síntese da cadeia (-) do DNA. À medida que esta transforma RNA em DNA, vai também degradando o RNA através da actividade da RNase H. Mas a degradação do RNA não é completa e o oligoribonucleótido terminal (que inclui a sequência repetida DR1) é emparelhado com a região DR2 (Fig. 4) perto do terminal 5' da mesma cadeia (-), onde actua como iniciador da síntese da cadeia (+). A síntese da cadeia positiva é então iniciada e quando termina a formação de partículas do core, contendo DNA vírico, estas vão ser envolvidas por AgHBs (para se transformar no vírus completo) durante a passagem pelo retículo endoplásmico ou pelo complexo de Golgi e secretadas para fora do hepatócito ou transportadas para o núcleo, onde se completa a síntese da cadeia positiva e se forma novamente o DNAccc. A saída da célula faz-se por exocitose (Murray et al., 2005; Fig.7).



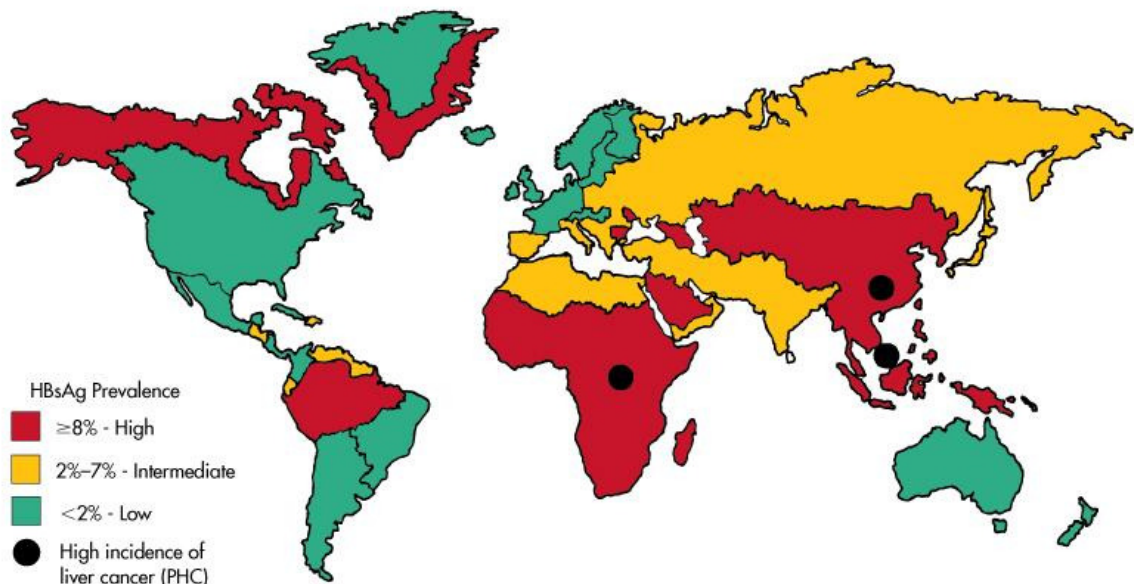
**Fig 7: Ciclo de replicação do VHB** (adaptado de Murray et al., 2005).



No hepatócito infectado, paralelamente à replicação de VHB completos, ocorre também em grande quantidade a síntese proteínas víricas isoladas e de subunidades proteicas dos seus invólucros, nomeadamente de HBsAg e HBeAg. Por isso, durante determinadas fases da evolução da hepatite B estes antígenos (Ags) poderão aparecer no sangue circulante em concentrações mais elevadas que as do VHB, podendo também ocorrer erros originando cadeias mutantes da hepatite B (Fonseca, 2007).

## 1.6. Epidemiologia

A infecção pelo VHB constitui um grave problema para a saúde pública. Aproximadamente um terço da população mundial tem evidências serológicas de ter infecção passada ou presente, calculando-se que mais de 2 bilhões de pessoas foram infectadas, e apesar de cerca de 90% dos pacientes evoluírem para a cura espontânea da infecção com aparecimento de anticorpos anti-HBs, estima-se que mais de 350 milhões de pessoas no mundo sejam doentes crónicos infectados pelo VHB (Alter, 2003; Murray et al., 2005; EASL, 2009; Fig. 8).



**Fig 8: Prevalência mundial dos portadores crónicos de hepatite B e do carcinoma hepatocelular primário**  
(imagem do CDC, adaptada de Murray et al., 2005)



O espectro da doença e história natural da hepatite B crónica é diversa e variável, podendo ir de um estado de portador inactivo com carga viral baixa a uma hepatite crónica progressiva que pode evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC). Os problemas hepáticos relacionados com o VHB ou o CHC são responsáveis por mais de um milhão de mortes por ano (20-30%) e, actualmente, representam 5-10% dos casos de transplante hepático (Ganem et al., 2004; Hoofnagle, 2007; EASL, 2009).

O hospedeiro e factores virais, bem como a co-infecção com outros vírus em especial o vírus da hepatite C (VHC), o vírus da hepatite Delta (VHD) e/ou o vírus da imunodeficiência humana (VIH), juntamente com outras co-morbilidades (incluindo o abuso de álcool e o excesso de peso) podem afectar o curso natural da infecção pelo VHB, bem como a eficácia das estratégias antivirais (Ganem et al, 2004; Hoofnagle, 2007; EASL, 2009).

### **1.7. Vias de Transmissão**

A maioria das pessoas desconhece a sua condição serológica e, se infectadas, constituem um elo importante na cadeia de transmissão da doença. O VHB transmite-se através do sangue, saliva, leite materno e dos fluidos sexuais dos indivíduos infectados, por inoculação parentérica, através de feridas e cortes ou picadas com objectos contaminados, e por transmissão intra-uterina e perinatal (Levinson, 2006; Macedo e Marinho, 2009).

O vírus é muito resistente, nomeadamente ao pH ácido, calor moderado e temperaturas baixas. É capaz de sobreviver no ambiente fora do hospedeiro, pelo menos por uma semana (Macedo e Marinho, 2009).

No plasma, a vida média do VHB varia de um dia a três dias, enquanto nos hepatócitos a vida média varia entre 10-100 dias (Locarnini, 2003, 2004).

O vírus é altamente infeccioso e sabe-se que uma só partícula viral é capaz de infectar o ser humano (Fonseca, 2007). O VHB circula em elevadas concentrações no sangue e em concentrações baixas noutros fluidos orgânicos, sendo aproximadamente 100 vezes mais infectante do que o VIH e 10 vezes mais do que o VHC (Fonseca, 2007; Macedo e Marinho, 2009; [http://www.saude.mg.gov.br/atos\\_normativos/resolucoes/2009/resolucao\\_2019.pdf](http://www.saude.mg.gov.br/atos_normativos/resolucoes/2009/resolucao_2019.pdf)).

A transmissão por transfusão sanguínea e de produtos derivados do plasma aproximou-se do risco zero na maioria dos países através do rastreio (“screening”) do HBsAg, anti-HBc, e mais recentemente pela implementação de testes de ácidos nucleicos (NAT) às dádivas de sangue (Kleinman e Busch, 2006; Lelie e Heaton, 2006; Fang, 2006). Actualmente os produtos derivados do plasma são sujeitos a um processo de inactivação viral (Alter, 2003; [http://www.saude.mg.gov.br/atosnormativos/resolucoes/2009/resolucao\\_2019.pdf](http://www.saude.mg.gov.br/atosnormativos/resolucoes/2009/resolucao_2019.pdf)).

## **1.8. Evolução da infecção pelo VHB**

A infecção pelo VHB caracteriza-se por ter um período de incubação longo com um início dissimulado. Com um período de incubação que vai de 4 a 12 semanas, a evolução da doença depende da resposta do sistema imunitário. A infecção pode ser aguda, fulminante ou crónica (Simão e Santos, 1994; Murray et al., 2005).

### **1.8.1. Hepatite Aguda**

Após o período de incubação, surge uma fase de infecção aguda que pode prolongar-se por 6 meses. Quando presentes, os sintomas ocorrem 1 a 3 meses após a infecção. Durante o período prodrómico pode haver sintomas como febre, mal-estar e anorexia, seguido de náuseas, vómitos, mal-estar intestinal e calafrios. Pouco depois aparecem sintomas clássicos de icterícia devido à lesão hepática tal como coloração amarelada das mucosas e da pele, urina escura e fezes claras. A recuperação caracteriza-se por uma descida da febre e aumento do apetite (Simão e Santos, 1994; Murray et al., 2005).

A maioria dos adultos (cerca de 90%) com função imunitária consegue eliminar o vírus e desenvolver imunidade específica em 6 meses (Murray et al., 2005; Fig.9).

Relativamente aos marcadores serológicos, esta fase caracteriza-se essencialmente por ter HBsAg e anti HBc IgM positivos (Zuckerman et al., 2009; Fig.9; Tab.2).

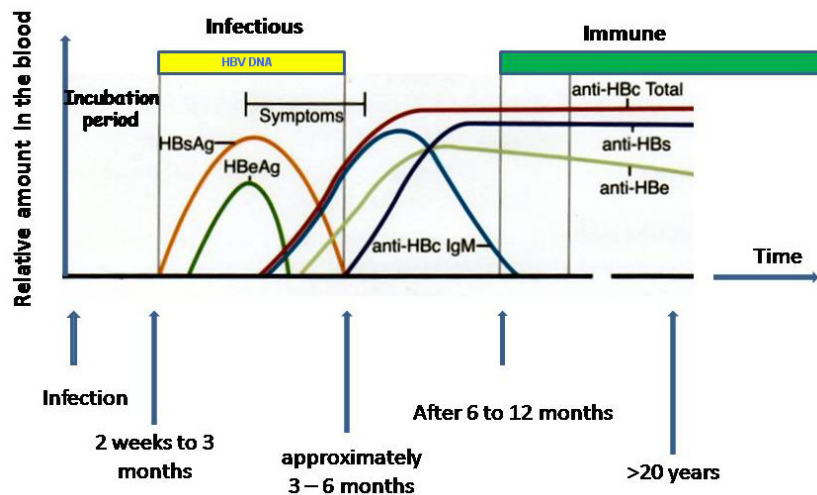


Fig. 9: Evolução da infecção aguda pelo VHB com recuperação (adaptada de medpediamedia.com/.../HBV\_serum\_markers.png).

### 1.8.2. Hepatite Fulminante

Aproximadamente 1% dos pacientes com icterícia evoluem para uma hepatite fulminante que pode ser mortal, caracterizando-se por terem sintomas mais graves e indícios de lesão hepática grave como ascite e hemorragia. A infecção pelo VHB pode favorecer o aparecimento de reações de hipersensibilidade devidas a imunocomplexos de HBsAg e de anticorpos, podendo produzir exantema, poliartrite, febre, vasculite necrotizante e glomerulonefrite (Murray et al., 2005).

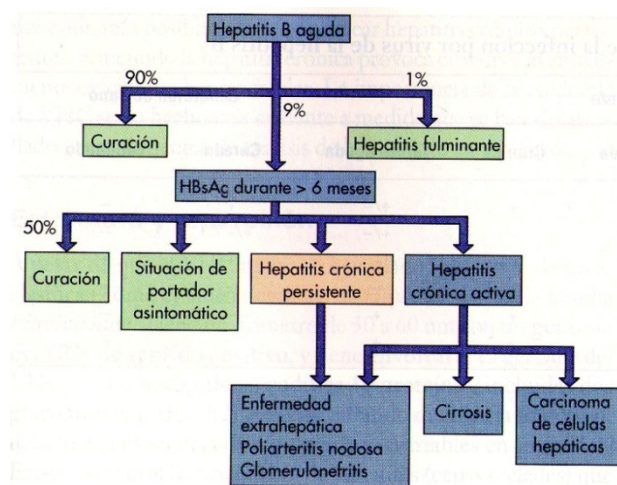


Fig. 10: Quadros clínicos da infecção aguda pelo VHB (adaptada de Murray et al., 2005)

### 1.8.3. Hepatite Crónica

Existe uma significativa proporção de doentes (5-10%) em que o vírus persiste em circulação por mais tempo, o que corresponde à infecção contínua e prolongada – hepatite B crónica (Atkinson, 1996; Fonseca, 2007). Nos recém-nascidos o sistema imunitário ineficaz e ainda em desenvolvimento leva a que 90% deste grupo desenvolva cronicidade (Lee, 1997; Fonseca, 2007; [pt.wikipedia.org/wiki/hepatite\\_B](http://pt.wikipedia.org/wiki/hepatite_B)).

Os portadores crónicos do vírus podem ter diferentes expressões clínicas, geralmente assintomáticos ou com limitada repercussão clínica visível, mas têm sobretudo perfis diferentes de virémias, variáveis com o tempo de evolução (Murray et al., 2005).

Nestes portadores, os níveis de DNA do VHB e das aminotransferases séricas (enzimas que existem no interior dos hepatócitos e que só são libertadas para o sangue com destruição destes) são elevados e há também uma grande actividade histológica na biópsia hepática. Em muitos doentes há seroconversão, traduzida no desaparecimento do HBeAg, aparecimento do HBeAc e paragem da replicação viral (Simão et al., 2007; [pt.wikipedia.org/wiki/hepatite\\_B](http://pt.wikipedia.org/wiki/hepatite_B)).

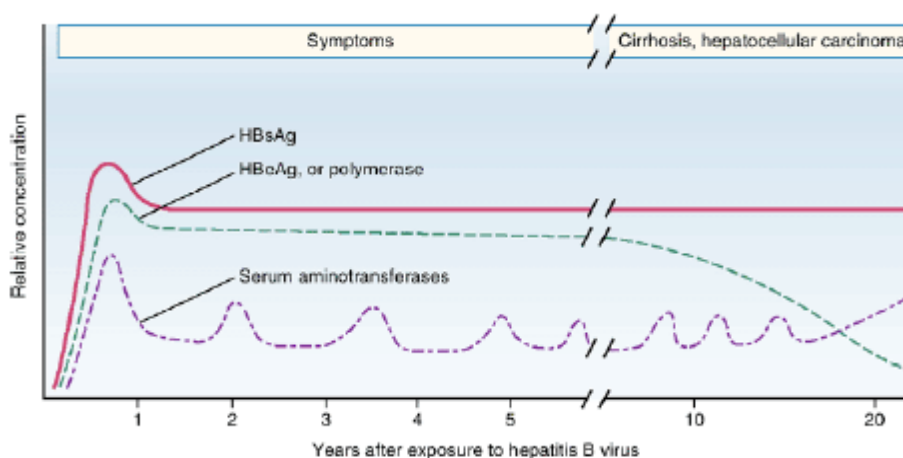


Fig. 11: Evolução típica da infecção crónica pelo VHB (adaptada de Engleberg, et. al., 2007).

De qualquer forma, os infectados quando não se seroconvertem, assim como os que mantêm actividade bioquímica após seroconversão e os que apresentam hepatite crónica HBeAg negativa podem acabar por desenvolver cirrose ou insuficiência hepática. Os portadores crónicos do VHB têm um risco de CHC cerca de 5-15 vezes superior aos não infectados (Simão et al., 2007).

Por outro lado, dentro dos portadores inactivos (caracterizados pela manutenção do HBsAg, HBeAg, DNA do VHB com títulos baixos, ALT normais e poucas ou nenhuma lesões histológicas), alguns (5-10%) poderão sofrer reactivação espontânea com HBeAg positivo, e outros (20-30%) poderão sofrer uma reactivação sob a forma de hepatite HBeAg negativa (Simão et al., 2007).

Os indivíduos com uma infecção crónica pelo VHB são a fonte principal de difusão do vírus e correm o risco de padecerem de um quadro fulminante se houver co-infecção pelo VHD (Murray et al., 2005).

**Tabela 2: Marcadores serológicos/virológicos da infecção pelo VHB** (adaptado de Abbott, 1994; Areias, 1997; Macedo e Marinho, 2009).

<b>Marcador</b>	<b>Características</b>
<b>Antigénio de superfície (AgHBs)</b>	Primeiro marcador serológico a surgir no decurso da infecção. Quando presente > 6 meses, define a infecção crónica.
<b>Anticorpo de superfície (Anti-HBs)</b>	A presença isolada indica imunidade (por vacina); associado a outros marcadores, representa infecção antiga com recuperação imunitária.
<b>Antigénio precoce “e” (AgHBe)</b>	Indica replicação activa do vírus, mas a sua ausência não significa o contrário. Na hepatite AgHBe negativa, a não detecção não reflecte nem ausência, nem benignidade da infecção.
<b>Anticorpo precoce “e” (Anti-HBe)</b>	Pode significar seroconversão, isto é, ao associar-se à perda de AgHBe. Esta seroconversão no sistema “e” é um aspecto importante nos casos submetidos a terapêutica antivírica, porque geralmente corresponde à viragem na replicação vírica, de níveis altos replicativos para níveis exíguos. No entanto, na hepatite crónica AgHBe negativa, o anti-HBe é o marcador visível deste tipo de infecção e não está relacionado com o nível (alto ou baixo) de carga vírica.
<b>Antigénio do core (AgHBc)</b>	Detectado apenas no tecido hepático; útil apenas em certas situações clínicas.
<b>Anticorpo do core (Anti-HBc)</b>	A presença deste anticorpo indica exposição prévia ao vírus B, sendo o primeiro anticorpo a aparecer, o único a ser detectado no período janela (quando diminui o HBsAg, mas ainda não se detecta o HBsAc e persistindo muitos anos após a resolução da infecção).
<b>Anticorpo do core tipo IgM (Anti-HBc IgM)</b>	A sua presença em títulos elevados determina a fase aguda da infecção ou de convalescença, títulos baixos de 1/1000 em fases crónicas e negativo em infecção passada.
<b>DNA do VHB</b>	É o marcador mais específico da replicação viral.
<b>DNA Polimerase</b>	A sua detecção é associada à presença do vírus completo e do HBeAg. Indica infecciosidade e replicação viral. A sua determinação é complicada e não se efectua de rotina.

## 1.9. Prevenção

Existem 3 maneiras de prevenir a infecção pelo VHB: a) pela modificação de comportamentos de risco para prevenir a transmissão; b) pela imunoprofilaxia passiva; e c) pela imunização activa através da vacina, sendo esta imunidade determinada pela detecção de Acs anti-HBs (Hou et al., 2005).

As primeiras vacinas desenvolvidas contra a hepatite B eram elaboradas a partir de plasma de portadores crónicos assintomáticos de HBsAg, sendo *a priori* eliminadas as partículas completas infecciosas do VHB (Szmuness et al., 1980).

Mais tarde estas foram substituídas por vacinas produzidas por engenharia genética com antígeno de superfície do HBV recombinante, pelo que aumentou consideravelmente a sua segurança e também a possibilidade de produzir uma grande quantidade, com redução de efeitos colaterais. Por exemplo, a vacina recombinante contra a hepatite B, desenvolvida pela Merck Sharp & Dohme (MSD) e aprovada pela FDA em 1986, é uma vacina não infecciosa de subunidade viral, que consiste no antígeno de superfície (AgHBs) do vírus da hepatite B produzido em células de levedura. De acordo com a informação fornecida juntamente com a vacina pelos fabricantes (Merck, West Point, EUA), uma fracção do gene do vírus da hepatite B, codificado para o AgHBs, é clonado no interior da levedura e a vacina contra a hepatite B é produzida a partir de culturas dessa cepa de levedura recombinante de acordo com os métodos desenvolvidos pelos laboratórios de pesquisa da MSD.

A implementação em massa dos programas de imunização, recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 1991, tem diminuído drasticamente a incidência da infecção pelo VHB entre os lactentes, crianças e adolescentes em muitos países (Castro, 1999; WHO, 2000).

A vacina da hepatite B é altamente eficaz: 85-96% dos vacinados desenvolvem anticorpos, o que é quase sempre uma boa protecção. Uma resposta imune diminuída pode, contudo, ser observada em pacientes que fazem hemodiálise e por indivíduos imunodeprimidos. Por este motivo, a dose deve ser duplicada nestes pacientes. Uma pequena percentagem de indivíduos vacinados não respondem adequadamente à vacinação, pelo que é necessário monitorizar os títulos de anticorpos anti-HBs, especialmente em profissionais de saúde e outros que estejam profissionalmente expostos a um alto risco de infecção (Reid e Grist, 1989).

## **1.10. Tratamento**

### **1.10.1. Hepatite Aguda**

Uma infecção aguda geralmente não é tratada mas deve ser monitorizada para ver a sua evolução. Não se requer nenhuma forma de tratamento específico nas formas agudas sintomáticas da hepatite B, uma vez que, como já referido, existe uma resolução espontânea da doença em mais de 90% das pessoas. Eventualmente estes pacientes poderão ser medicados para as náuseas e vômitos. A ingestão de álcool em qualquer quantidade é proibida (<http://www.abcdasaude.com.br/artigo.php?229>).

### **1.10.2. Hepatite Crónica**

Nas últimas décadas houve grandes progressos no tratamento do VHB. O principal objectivo do tratamento é a supressão mantida da replicação do VHB, de forma a diminuir o processo necro-inflamatório no fígado e assim, impedir a progressão da fibrose. A interrupção da fibrogénese previne a evolução para cirrose e as suas complicações, nomeadamente o carcinoma hepatocelular, melhorando consequentemente a sobrevivência (Zoulin, 2006; Simão et al., 2007).

Os objectivos da terapêutica incluem: a) a resposta bioquímica pela normalização das ALT; b) a resposta virológica pela redução do DNA do VHB sérico para níveis indetectáveis, ou seja, a tão baixo nível quanto possível, idealmente abaixo do limite inferior de detecção de ensaios de PCR em tempo real (10-15 UI / ml) e também a perda do HBeAg em doentes com este marcador inicialmente positivo; e c) a resposta histológica pela redução da actividade histológica (Simão et al., 2007). Estes objectivos permitirão assim assegurar um grau de supressão virológica que irá conduzir a remissão bioquímica, histológica e uma melhor prevenção de complicações (Zoulin, 2006; EASL, 2009).

O principal alvo do tratamento actual para hepatite B crónica é a polimerase do VHB. A sua actividade pode ser inibida por análogos de nucleosídeos tal como a lamivudina e o entecavir, e nucleótidos análogos tal como adefovir. Mas após a aplicação destes a longo prazo a incidência de resistência à droga e o aparecimento de mutantes do VHB é elevada (Buster e Janssen, 2006).

Os nucleosídeos e nucleótidos análogos (NUCs) referidos são geralmente aplicados em combinação com interferão-alfa (INF- $\alpha$ ) peguado, que estimula a resposta dos antivirais do sistema imunitário (Buster e Janssen, 2006). Actualmente existem sete drogas disponíveis para o tratamento da hepatite B, das quais cinco foram aprovadas na Europa: INF- $\alpha$  convencional ou peguado (que prolonga o efeito), lamivudina, adefovir/adefoviro dipivoxil (forma oral), entecavir, e telbivudina (EASL, 2009).

O interferão foi o primeiro a ser utilizado para o tratamento destas infecções podendo levar a uma resposta sustentada (perda do DNA do vírus e do AgHBe) até um terço dos casos tratados. Especificamente, este é uma citocina que actua por dois mecanismos: a) através da inibição da síntese de DNA viral; b) através de uma acção imuno-moduladora que se expressa com o aumento dos antígenos de histocompatibilidade da classe I da membrana dos hepatócitos e através da estimulação da actividade dos linfócitos T auxiliares e “natural killer” (Ferreira e Borges, 2007).

A lamivudina foi o primeiro análogo nucleosídeo utilizado e inibe directamente a DNA polimerase (Simão et al., 2007). Este fármaco actua especificamente em pacientes com AgHBe positivo, apresentando uma melhoria histológica em 52% dos casos, e ainda decréscimo do DNA sérico em 44% dos casos e sero-conversão do AgHBe para anti-HBe em 17% dos casos (Ferreira e Borges, 2007). Infelizmente, a incidência de resistência do vírus à lamivudina e consequente aparecimento de mutações no VHB (Niesters et al., 1988), aumenta com a duração do tratamento, variando de 14% no primeiro ano a 70% após 5 anos de uso (Ferreira e Borges, 2007).

O adefovir é um análogo nucleotídeo da adenosina monofosfato. O adefoviro dipivoxil é o medicamento oral do adefovir e no organismo é convertido em difosfato, um metabolito que interage com a DNA polimerase do vírus. Este medicamento tem aproximadamente os mesmos resultados que a lamivudina mas permite tempos de tratamento mais prolongados (Simão et al., 2007; Ferreira e Borges, 2007).

O entecavir é o mais potente inibidor da DNA polimerase; no organismo é fosforilado em trifosfato pelas cinases celulares e tem percentagens mais eficazes que a lamivudina ou o adefovir (Simão et al., 2007; Ferreira e Borges, 2007).

Por último, a telbivudina, um análogo de nucleosídeo, apresenta uma actividade potente, selectiva e específica sobre os hepadnavírus, bloqueando rapidamente a replicação viral (Ferreira e Borges, 2007).



Existem outros fármacos, tais como telbivudina, emtricitabina e clevudine, que poderão ser, futuramente, novas armas no controle da HBC (Ferreira e Borges, 2007).

Uma resposta sustentada ao INF- $\alpha$  e/ou nucleosídeos análogos/ análogos de nucleotídeos (NUCs) requer, assim, a carga do DNA do VHB com níveis indetectáveis, sendo necessária para reduzir o risco de resistência aos NUCs. Também aumenta a probabilidade de seroconversão de HBe em pacientes HBeAg-positivos e a negatificação do HBsAg (EASL, 2009; [http://www.sbinfectoorg.br/anexos/Consenso%20SBI\\_Manuseio%20e%20Terapia%20da%20Hepatite%20B\\_2006.pdf](http://www.sbinfectoorg.br/anexos/Consenso%20SBI_Manuseio%20e%20Terapia%20da%20Hepatite%20B_2006.pdf)).

A EASL publicou em 2009 que a definição de resposta à terapêutica antiviral varia de acordo com o tipo de terapêutica administrada, devendo ser feita uma distinção clara entre as respostas (ou não respostas obtidas):

- **Uma não resposta primária quer para INF- $\alpha$  ou para NUCs** é definida com a descida de menos de 1 log<sub>10</sub> do DNA do VHB às 12 semanas de terapêutica.

- **Uma resposta virológica para o INF- $\alpha$**  requer a carga viral do DNA do VHB inferior a 2000 UI/ml às 24 semanas de terapêutica.

- **Uma resposta virológica para NUCs** requer a carga viral do DNA do VHB indetectável em 48 semanas de terapêutica.

- **Uma resposta virológica parcial para NUCs** é definida pelo DNA do VHB detectável por PCR-RT em que deve haver a descida de pelo menos 1 log<sub>10</sub> IU/ml na carga viral do DNA do VHB às 24 semanas de terapêutica.

- **Um *breakthrough* virológico** é definido com o aumento (confirmado) de mais de 1 log<sub>10</sub> IU/ml na carga viral do DNA do VHB às 24 semanas de terapêutica. Esta situação deve-se, na maioria das vezes à baixa aderência à terapêutica e ao desenvolvimento de resistências à terapêutica antiviral (EASL, 2009).

Nenhuma medicação consegue erradicar de maneira eficaz o VHB dos hepatócitos. Nenhum antiviral consegue a curto prazo diminuir os níveis de cccDNA dos hepatócitos de forma eficaz, e seriam necessários muitos anos de tratamento com análogos de nucleosídeos/nucleótidos (NUCs), por exemplo, para se conseguir erradicar estes mini círculos dos núcleos das células hepáticas (Ferreira e Borges, 2007). Contudo, o desenvolvimento de fármacos antivirais mais potentes e novas combinações de medicamentos, conjuntamente com uma melhor compreensão dos mecanismos de resistência do VHB à terapêutica são importantes conquistas para melhorar a eficácia do

tratamento e diminuir no futuro, a carga global de portadores do vírus da hepatite B (Ferreira e Borges, 2007).

### 1.11. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da hepatite B realiza-se por meio dos marcadores serológicos do vírus da Hepatite B e deve não só identificar as pessoas com anticorpos contra a doença, mas também diferenciar aqueles que já tiveram a doença aguda ([http://pt.wikipedia.org/wiki/Hepatite\\_B](http://pt.wikipedia.org/wiki/Hepatite_B)).

Apesar da hepatite B ser habitualmente diagnosticada pela detecção do HBsAg no soro, nenhum marcador, por si só, revela toda a história da infecção pelo VHB. É a sua combinação que permite ao clínico aferir do diagnóstico e da necessidade de tratamento.

**Tabela 3: Interpretação dos marcadores do VHB no diagnóstico da hepatite B** (adaptada de Fonseca, 2007; Zuckerman et al., 2009; [www.hepcentro.com.br/hepatite\\_b.htm](http://www.hepcentro.com.br/hepatite_b.htm)).

Marcadores do VHB	Hepatite B				Estado
	Aguda	Crónica Activa	Crónica inactiva	Curada	Pós - Vacina
HBsAg	+	+	+	-	-
HBeAg	+	+	-	-	-
Anti-HBc IgG	-	+	+	+	-
Anti-HBc IgM	+	-	-	-	-
Anti-HBs	-	-	-	+	+
Anti-HBe	+	-	+	+	-
DNA-VHB	+	+	-	-	-

Na tabela 3 podemos observar os diversos padrões serológicos na hepatite B. O episódio agudo é diagnosticado pela detecção no sangue de AgHBs e AgHBe, e de Acs anti-HBc do tipo IgM (Zuckerman et al., 2009). Simultaneamente apresenta um aumento significativo do valor das transaminases. A infecção passada e resolvida caracteriza-se pela detecção de Acs anti-HBs e anti-HBc do tipo IgG. O doente crónico frequentemente apresenta no sangue AgHBe e AgHBs e Acs anti-HBc do tipo IgG. Além disso, pode ter

transaminases elevadas (hepatite activa) e testes de ácidos nucleicos positivos para a presença do DNA do VHB no sangue ([http://pt.wikipedia.org/wiki/Hepatite\\_B](http://pt.wikipedia.org/wiki/Hepatite_B)).

Testes que reflectem a lesão hepatocelular (retirado de [http://www.aids.gov.br/assistencia/manual\\_dst/hepatite.htm](http://www.aids.gov.br/assistencia/manual_dst/hepatite.htm)):

- As aminotransferases: a alanina aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST) encontram-se geralmente acima de 500 UI/l.
- A elevação da bilirrubina total, podendo alcançar níveis entre 5 e 20 mg/dl.
- A fosfatase alcalina geralmente está aumentada.
- O leucograma geralmente revela neutropenia com linfocitose relativa.

Actualmente, a biópsia hepática na hepatite B não tem papel no seu diagnóstico: os marcadores serológicos e virológicos definem a presença da infecção. O grande papel que desempenha é sobretudo no estadiamento (e estabelecimento do prognóstico), bem como na necessidade de inclusão de um doente num regime de terapêutica antivírica. A histologia hepática é assim cada vez mais proposta aos doentes e permite caracterizar quantitativamente o grau de inflamação e fibrose, ou seja, estadiar a própria doença hepática. A biópsia hepática tornou-se um instrumento adicional e muito valioso para decisão clínica individualizada (APEH, 2009).

## **1.12. Os testes laboratoriais**

### **1.12.1. Estudo serológico do VHB**

Os testes serológicos, ou seja aqueles que detectam as reacções Ag-Ac, são por vezes o único meio de diagnóstico de algumas doenças infecciosas, quando não se dispõe de outros exames complementares (Valente et al., 1993).

Para o diagnóstico serológico existem métodos qualitativos e métodos quantitativos, que nos traduzem o contacto, ou não, com o Ag em causa. À produção de anticorpos (Acs) segue-se uma estimulação antigénica, sendo a sua taxa variável, dependendo da sua síntese, velocidade de degradação e fase da doença (Lapatie, 1989; Valente et al., 1993).

O organismo humano, quando em contacto com um Ag, responde fracamente, com a produção de Acs (resposta primária) e mais fortemente em contactos posteriores (resposta secundária). Inicialmente desenvolvem-se Acs predominantemente da classe IgM (que pressupõem o diagnóstico de infecção recente) aparecendo depois os da classe IgG, que passam a predominar, apresentando uma maior especificidade do que a imunoglobulinas da classe IgM (Lapatie, 1989;Valente et al., 1993).

Existem diferentes técnicas laboratoriais para detecção serológica de Ags e Acs que surgem em diferentes estadios da infecção pelo VHB sendo a determinação do HBsAg o marcador serológico mais utilizado em rotina que diagnostica a infecção (Tab. 2).

Antes do aparecimento das técnicas ELISA (testes imunoabsorventes ligados a enzimas) só se conseguia detectar o HBsAg por técnicas relativamente pouco sensíveis, como a difusão em gel de agar. Na década de setenta do século passado, Wolters et al. (1975) publicaram um procedimento ELISA para a detecção de HBsAg em microplacas, cuja sensibilidade, determinada pela utilização de um painel de soros de referência, era equivalente à do radioimunoensaio (RIA), que por sua vez tinha várias desvantagens, nomeadamente a estabilidade precária, a semi-vida dos marcadores radioactivos, os custos e o perigo para o utilizador.

Actualmente a grande maioria dos testes utilizados no diagnóstico serológico são métodos por enzimaímunoensaio (EIA), enzimaímunoensaio em micropartículas (MEIA) e ELISA que podem ser bem padronizados, fornecem o resultado final pela leitura em aparelhos, de forma objectiva e permitem que os processamentos possam ser automatizados. Contudo, todos estes métodos apresentam a mesma sensibilidade ( $< 0,5$  ng AgHBs/ml). O importante é que o método empregado utilize anticorpos monoclonais e, se possível, se conheça a natureza dos mesmos, para efeito de comparação de resultados. ([http://www.hemonline.com.br/artigos\\_publicacao.php?id=2](http://www.hemonline.com.br/artigos_publicacao.php?id=2)).

O método confirmatório, para o estado de infecção pelo vírus da hepatite B é a PCR do DNA do VHB ([http://www.hemonline.com.br/artigos\\_publicacao.php?id=2](http://www.hemonline.com.br/artigos_publicacao.php?id=2)).

### **1.12.2. Estudo Molecular do DNA do VHB**

As técnicas baseadas em biologia molecular são uma ferramenta importante para lidar com as hepatites virais (Pawlotsky, 2002; Vernet, 2004). Os progressos verificados

em tecnologia molecular aumentaram a sensibilidade de detecção do DNA viral e facilitaram as investigações na relação entre a virémia do DNA do VHB e a progressão da doença (Sablon et al., 2004; Bowden et al., 2008).

Para o clínico, a detecção e quantificação do DNA do VHB é particularmente importante no estabelecimento da indicação para o tratamento, na decisão de seleccionar e ajustar protocolos de terapêutica e na avaliação da resposta aos antivirais, incluindo o desenvolvimento de resistências, na monitorização da doença, embora seja também realizada em alguns casos para diagnóstico e estabelecimento de prognóstico (Lok et al., 2001; Simão et al., 2007; Pawlotsky et al., 2008; EASL, 2009).

O DNA do VHB pode ser detectado, identificado (através da genotipagem) e quantificado através de tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos, como é o caso da Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR). A PCR foi concebida em 1983, por Kary Mullis um geneticista ao serviço da Cetus Corporation, (reconhecido com o Nobel da Química em 1993), que desenvolveu um método que permite sintetizar, em poucas horas e *in vitro*, uma grande quantidade de um determinado fragmento de DNA (Roche Diagnostics, 2003).

A PCR está desenhada de acordo com o princípio natural de replicação de DNA. Este é um processo que decorre em três etapas, que em conjunto se designam como um ciclo e que se repete um número específico de vezes. Assim, um ciclo de PCR consiste nas seguintes etapas: desnaturação, hibridização ou “annealing” e extensão (<http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=339>; Fig. 12).

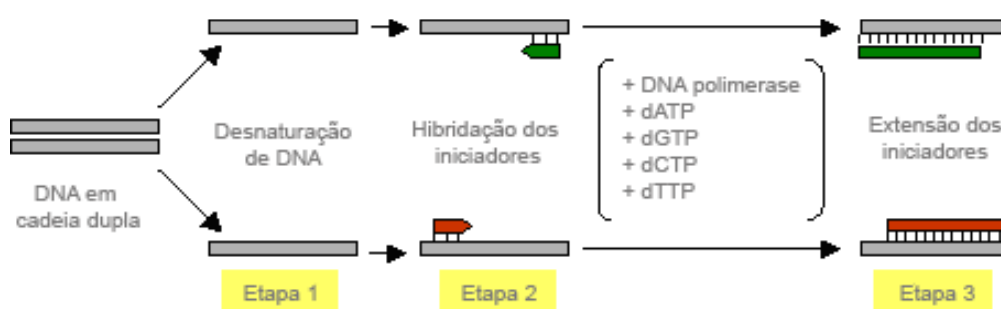


Fig. 12: Etapas do processo da PCR (adaptada de <http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=339>).

**Etapa1: Desnaturação** do DNA alvo pelo calor, (geralmente > 90°C) de modo a separar a cadeia dupla de DNA em dois filamentos. Os dois filamentos ou cadeias de DNA são mantidos juntos por ligações de hidrogénio que, por serem relativamente fracas,

quebram-se a altas temperaturas, ao passo que as ligações entre as moléculas de fosfato e desoxirribose, por serem ligações covalentes, permanecem intactas a uma temperatura elevada (<http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=339>; Fig. 12).

Etapa 2: **Hibridização ou “Annealing”** dos iniciadores por ligações de hidrogénio ao DNA alvo em cadeia simples. Para permitir essa associação, a mistura de reacção é arrefecida (entre 40 e 65°C: a temperatura a usar depende do comprimento dos “primers” e da sequência a amplificar, pelo que a escolha criteriosa desta temperatura permite que estas sequências iniciadores se liguem à sequência alvo com elevada especificidade). Os iniciadores (ou “primers”) marcam as extremidades da sequência-alvo: estes iniciadores são curtas sequências sintéticas de nucleótidos, entre 20 e 30 bases. Numa reacção de PCR são incluídos dois “primers” que se ligam (hibridizam) com a sequência complementar.

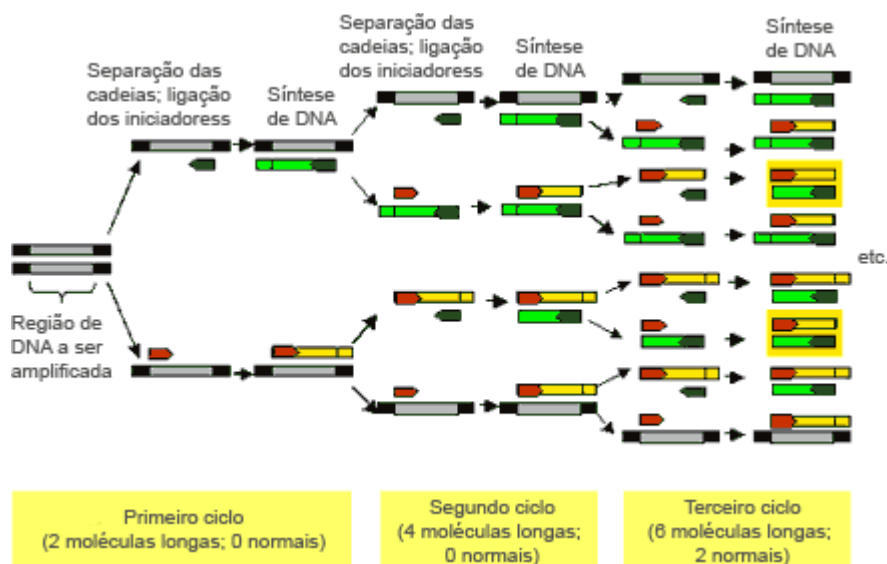
Etapa 3: **Extensão** dos iniciadores através da síntese da cadeia complementar de cada cadeia molde, catalisada pela DNA polimerase (a 72°C) Após a ligação dos “primers” às sequências complementares de DNA, a temperatura eleva-se a aproximadamente 72 °C e a enzima Taq polimerase replica a cadeia de DNA (<http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=339>; Fig. 12).

Para realizar a PCR são necessárias pequenas quantidades do DNA alvo, um tampão salino contendo a polimerase, oligonucleótidos iniciadores, os quatro desoxinucleótidos (dNTPs) constituintes do DNA e o co-factor  $Mg^{2+}$ . Esta mistura é submetida a um processo de 3 etapas e vários ciclos de amplificação.

A Taq polimerase é uma polimerase de DNA termo-estável recombinante do organismo *Thermus aquaticus*, que, contrariamente às outras enzimas polimerases, se mantém activa a temperaturas elevadas. O processo de síntese é iniciado numa zona de cadeia dupla (onde se encontram os “primers” ligados), incorporando os nucleótidos, que são complementares à sequência alvo, e utilizando os dNTPs em solução ([www.roche.pt/portugal/index.cfm/.../intro-pcr/](http://www.roche.pt/portugal/index.cfm/.../intro-pcr/)).

A extensão inicia-se sempre no extremo 3' do “primer”, criando uma cadeia dupla a partir de cada uma das cadeias simples. A Taq polimerase sintetiza exclusivamente na direcção 5' para 3'. Durante a PCR são usadas elevadas temperaturas de forma a separar as moléculas de DNA em duas cadeias simples, permitindo então a ligação de oligonucleótidos iniciadores (“primers”), também em cadeia simples com cerca de 15 a 30 nucleótidos, obtidos por síntese química. Para amplificar uma região específica são

necessários dois iniciadores complementares das sequências que flanqueiam o fragmento de DNA a amplificar, nos seus terminais 3', de modo a permitir a actuação da DNA polimerase durante a síntese da cadeia complementar, usando como molde cada uma das duas cadeias simples constituintes do DNA a amplificar (<http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=339>).



**Fig. 13: Ciclos da PCR** (imagem adaptada de <http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=339>).

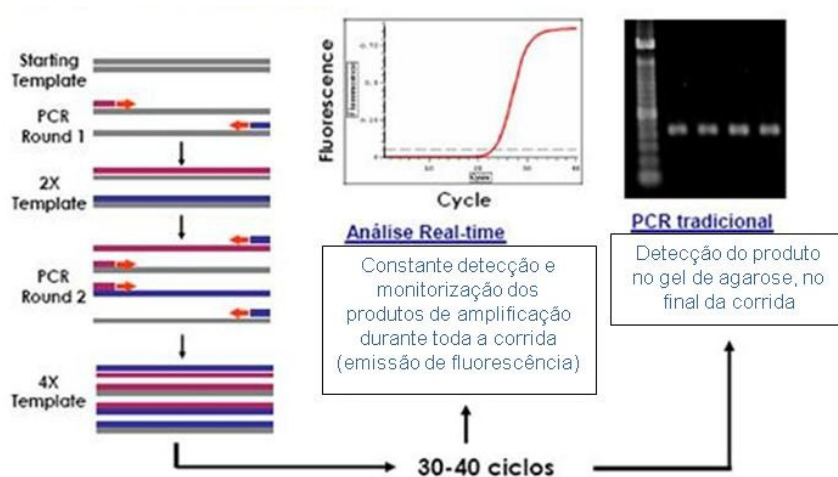
Este processo tem lugar num termociclador, um equipamento automático que controla e alterna as temperaturas durante períodos programados de tempo para o número apropriado de ciclos de PCR (geralmente entre 25 a 40 ciclos) sendo possível aumentar, em cada ciclo, duas vezes a concentração de DNA pré-existente (Fig. 13). Em teoria, se for possível levar a cabo 25 ciclos de amplificação seguidos, a concentração de DNA aumentaria  $2^{25}$  vezes embora, na prática, devido a alguma ineficiência no processo de amplificação, esse aumento se fique por um milhão de vezes. O produto da PCR pode ser visualizado após electroforese em gel de agarose e o seu tamanho ser estimado por comparação com padrões lineares de DNA (<http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=339>).

A PCR tradicional permitiu que fossem desenvolvidas novas tecnologias baseadas neste processo, nomeadamente a PCR em tempo real (PCR-RT) e por hibridização tal como o branched DNA (b-DNA).

O princípio da PCR-RT é baseado na detecção e quantificação de um sinal fluorescente durante a amplificação por PCR (Roche Diagnostics, 2003). Existem 3

metodologias principais para a PCR-RT: por sondas hidrolisáveis (TaqMan, Beacons e Scorpions), por sondas hibridizáveis (Light Cycler) e por agentes ligantes ao DNA (SYBR Green; <http://www.slideshare.net/labimuno/realtime-presentation>).

A PCR-RT apresenta grandes vantagens relativamente à PCR tradicional tais como: mais específica, sensível e reprodutível, tem maior extensão dinâmica (até 1010 x), requer 1000x menos DNA que os demais ensaios (3 picogramas = 1 genoma), confirmação da amplificação específica (análise da curva de “melting”) sendo a análise feita em tempo real pela constante detecção e monitorização dos produtos de amplificação durante toda a corrida (emissão de fluorescência) enquanto que na PCR tradicional a detecção do produto é feita no final do processo no gel de agarose ([http://www.ibb.unesp.br/extensao/acidos nucleicos/material\\_didatico](http://www.ibb.unesp.br/extensao/acidos_nucleicos/material_didatico); Fig. 14).



**Fig. 14: PCR tradicional versus PCR em tempo real** (imagem adaptada de [http://www.ibb.unesp.br/extensao/acidos nucleicos/material\\_didatico](http://www.ibb.unesp.br/extensao/acidos_nucleicos/material_didatico)).

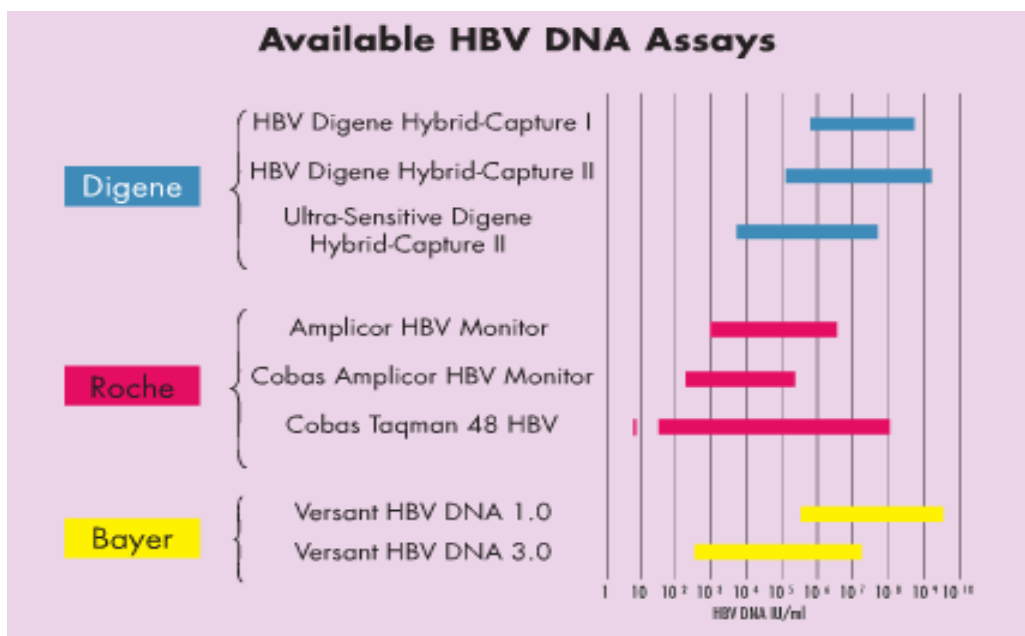
A PCR-RT é assim bastante recomendada para a monitorização da hepatite B, pela sua sensibilidade, precisão, alta especificidade, simples, rápida, reprodutibilidade e limites dinâmicos máximos, quando comparado com outros testes, como a PCR clássica ou o bDNA (Chopra et al., 2005; Rosin et al., 2006; Watzinger, 2006; Garbuglia et al., 2007; Tiziano et al., 2007; Fig.15).

Se não existir um teste de PCR em tempo real disponível, a carga viral do DNA do VHB deve ser efectuada pelo teste mais sensível possível (EASL, 2009).

A World Health Organization (WHO) definiu uma medida internacional para normalizar a expressão das concentrações do DNA do VHB. Os níveis séricos do DNA do



VHB devem ser expressos em UI/ml (1UI/ml=5,6 cópias/ml) para se poder comparar cargas virais entre as várias metodologias, contudo, deve ser usado o mesmo teste no mesmo paciente para avaliar a eficácia antiviral (EASL, 2009).

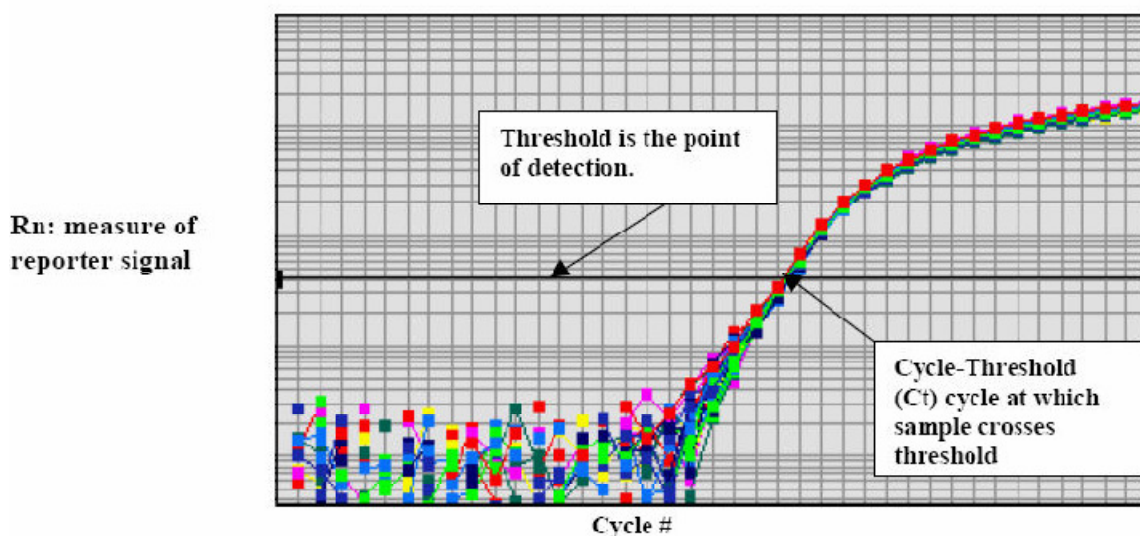


**Fig.15:** Comparação de alguns testes de PCR para o DNA do VHB: o teste Cobas TaqMam 48 HBV por PCR-RT, distinguindo-se bem a sensibilidade acrescida deste (<10 UI/ml) em relação aos restantes testes, nomeadamente o Versant HBV DNA 3.0 (b-DNA) que tem um limite de detecção de entre 10<sup>2</sup> e 10<sup>3</sup>UI/ml (imagem adaptada de EASL, 2003).

Existem vários testes comerciais para determinar a carga viral do DNA do VHB por PCR-RT, tais como: RealTime HBV DNA da Abbott, RealArt™ HBV RG PCR da Quiagen, Cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan HBV da Roche Diagnostics, entre outros.

O primeiro teste de PCR-RT para o VHB adquirido pelo Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Sangue e Medicina Transfusional (SSMT) dos Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE (HUC, EPE), foi o RealArt™ HBV RG PCR da Quiagen. Este teste era utilizado com o Rotor-Gene™ 3000 da Corbett Research. Além de ter de se fazer a extracção das amostras num aparelho suplementar, que extrai o DNA do VHB de apenas 24 amostras por corrida, tem também toda a pipetagem e preparação de reagentes manual o que aumenta o risco de contaminação e erro humano. Saliente-se ainda neste teste, a dificuldade de interpretação de resultados, uma vez que tem de ser o utilizador a otimizar a linha do “threshold”: nível de  $\Delta Rn$  (magnitude do sinal do alvo normalizado pelo sinal da referência passiva gerado pela PCR), utilizado para a determinação do ciclo-“threshold” (Ct). O Ct é o ciclo onde é primeiramente detectado um aumento significativo

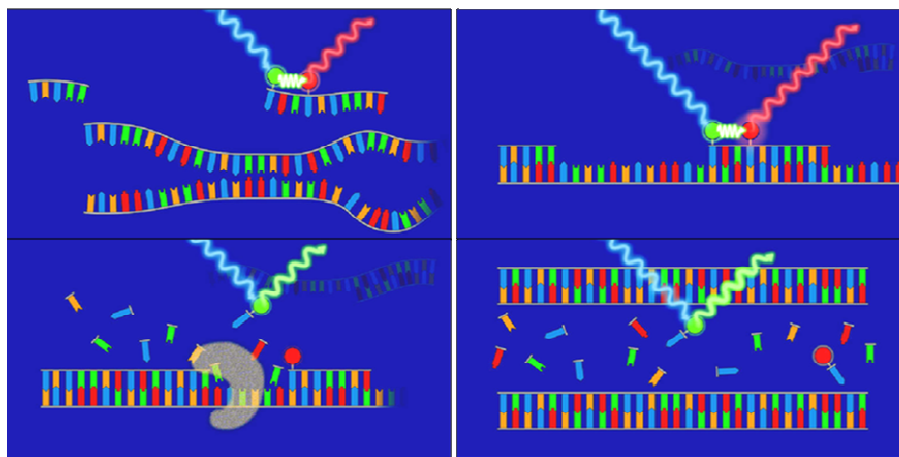
na quantidade de produto amplificado (<http://www.slideshare.net/labimuno/realtime-presentation>; Fig.16).



**Fig. 16: PCR-RT com visualização da linha do “threshold”, do Ct e da fluorescência emitida ao longo dos ciclos**  
(adaptada de [http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtPCR\\_vs\\_tradPCR.pdf](http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtPCR_vs_tradPCR.pdf)).

Para superar estas dificuldades o Laboratório optou posteriormente pelo teste Cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan HBV (Roche Diagnostics) que é um teste comercial de PCR em tempo real, pelo método de TaqMan (Fig. 17), para amplificação de ácidos nucleicos *in vitro* destinado à detecção e quantificação do DNA do VHB através do instrumento Cobas® AmpliPrep (extracção automática de de DNAs ou RNAs de produtos biológicos tal como soro e plasma) para processamento automatizado das amostras, e do analisador Cobas® Taqman 48 para amplificação e detecção automatizadas (Hochberger et al., 2006; Rosin et al., 2006; Tiziano et al., 2007).

O método de TaqMan da PCR-RT utiliza uma sonda marcada com uma molécula fluorescente sinalizadora (“reporter”) e outra de supressão intramolecular (“quencher”), além do par de oligoiniciadores (“primers”) que se utilizam na PCR comum. A sonda é constituída de uma sequência alvo que está entre os dois oligo iniciadores. Enquanto a sonda está livre em solução, o “reporter” e o “quencher” que ficam nas extremidades da sonda só emitem sinal quando são separados por meio da clivagem da sonda pela enzima Taq DNA polimerase durante a reacção. Portanto, durante a reacção, quando as sondas se ligam na sequência-alvo, o “reporter” e o “quencher” são separados, e a fluorescência emitida pode ser quantificada pela máquina (Martinhago et al., 2006; Fig. 17).

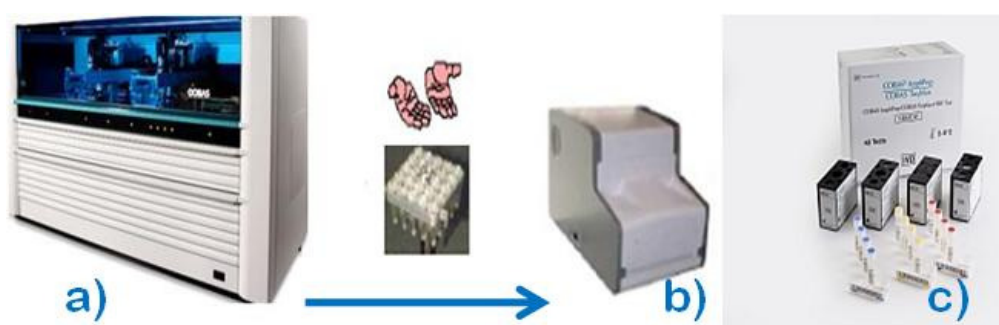


É esta também a base da metodologia no teste Cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan HBV que está descrita na bula do fabricante (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, EUA; Anexo 1). A utilização de sondas fluorescentes duplamente marcadas permite a detecção em tempo real da acumulação de produtos da PCR pela monitorização da emissão da intensidade dos corantes sinalizadores fluorescentes (“reporter”) libertados durante o processo de amplificação. As sondas consistem sequências oligonucleotídicas específicas para o VHB e para o Padrão de Quantificação (PQ) do VHB com um corante sinalizador e um corante supressor (“quencher”). No teste Cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan HBV, as sondas do VHB e do PQ do VHB estão marcadas com diferentes corantes sinalizadores fluorescentes. Quando estas sondas estão intactas, a fluorescência do corante sinalizador é suprimida pela proximidade do corante supressor. Durante a PCR, a sonda hibridiza a sequência alvo e é clivada pela actividade da nuclease 5’-3’ da polimerase do DNA Z05 termoestável. Quando os corantes de sinalização e supressão são libertados e separados, a supressão deixa de ocorrer e é aumentada a actividade fluorescente do corante sinalizador (Fig.17).

A amplificação do DNA do VHB e do DNA do PQ do VHB é determinada independentemente em diferentes comprimentos de onda. Este processo é repetido durante um número definido de ciclos, sendo a intensidade da emissão dos corantes sinalizadores individuais aumentada eficazmente em cada ciclo, permitindo a identificação independente do DNA do VHB e do DNA do PQ do VHB. O ciclo de PCR onde uma curva de

crescimento inicia um crescimento exponencial está relacionado com a quantidade de material iniciador no princípio da PCR.

O objectivo de desenvolver este teste Cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan HBV (combinação do Cobas TaqMan ao Cobas AmpliPrep) foi de combinar as vantagens da PCR-RT com um elevado nível de automatização e conveniência no manejo. Este sistema oferece uma versão completamente automatizada que requer apenas dois únicos contactos do técnico com as amostras: na pipetagem destas para os “input” tubos e no transporte do suporte (“k-carrier”) com os “k” tubos (com a amostra já preparada) do Cobas® AmpliPrep para o Cobas® TaqMan (Fig. 18), diminuindo assim os riscos de contaminação. (Chevaliez et al., 2008; <http://www.scribd.com/doc/2075721/Cobas-TaqMan-48>; Bula do teste Cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan HBV).



**Fig 18: a) Cobas® AmpliPrep; b) Cobas® TaqMan; c) Kit para teste Cobas® AmpliPrep/TaqMan® HBV da Roche Diagnostics** (adaptada de <http://www.scribd.com/doc/2075721/Cobas-TaqMan-48>).

Este teste incorpora ainda padrão de quantificação (QS) interno em cada amostra desde a lise para controlar um processamento inadequado da amostra na purificação do DNA do VHB e também para precaver de substâncias inibidoras. O kit contém reagentes prontos a usar, o que também diminui os erros e as contaminações (<http://www.scribd.com/doc/2075721/Cobas-TaqMan-48>; Bula do teste Cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan HBV).

O teste Cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan HBV foi validado apenas para utilização de plasma humano colhido com anticoagulante EDTA. O mesmo sistema utilizado para detectar e quantificar o vírus da hepatite C está validado e preparado para

utilização de amostras de plasma e de soro (<http://www.scribd.com/doc/2075721/Cobas-TaqMan-48>).

No início deste trabalho de dissertação, os estudos disponíveis, para amostras de soro, foram feitos apenas com o Cobas Taqman, não existindo informação sobre a combinação deste com o instrumento Cobas AmpliPrep (Zhao et al., 2005; Toyoda et al., 2007; <http://www.scribd.com/doc/2075721/Cobas-TaqMan-48>).

A validação desta combinação, para amostras de soro, tornou-se assim um dos objectivos deste trabalho. Uma versão recentemente lançada pela Roche (Cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan HBV 2.0) permite esta combinação embora apresente menor sensibilidade ([www.cobas-roche.co.uk/site/what's New\\_asp?article](http://www.cobas-roche.co.uk/site/what's%20New.asp?article)).

Na tabela 4 podemos comparar o teste Cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan HBV com a sua nova versão e com o teste Versant HBV DNA 3.0 por b-DNA da Siemens.

**Tabela 4: Características e comparação de alguns testes de PCR para o DNA do VHB : o teste Versant HBV DNA 3.0 por b-DNA, o teste Cobas TaqMam 48 HBV por PCR-RT, e a 2ª versão deste.**

	Versant <sup>®</sup> HBV DNA 3.0 (Siemens)	COBAS <sup>®</sup> AmpliPrep/COBAS <sup>®</sup> TaqMan <sup>®</sup> HBV Test (Roche)	COBAS <sup>®</sup> AmpliPrep/COBAS <sup>®</sup> TaqMan <sup>®</sup> HBV Test v2.0 (Roche)
Metodologia	bDNA	RT-PCR	RT-PCR
PCR Qualitativa	-	✓	✓
PCR quantitativa	✓	✓	✓
Amostra de plasma	✓	✓	✓
Amostra de Soro	✓	-	✓
Volume de amostra (µl)	50	1000	650
Sensibilidade (UI/ml)	357	12	20
Tempo execução (96t)	21h	9h	9h
Nº testes/Kit	96	48	72
Lançamento no mercado	2002	Setembro. 2007	Abril. 2009

## **CAPÍTULO II**

## 2.1. - Justificação do Estudo

A validação do teste Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HBV no laboratório de Biologia Molecular do SSMT dos HUC,EPE, nas amostras de soro justifica-se pela orgânica de todo o processo que envolve a colheita da amostra nos mais variados serviços do hospital, assim como amostras que chegam do exterior e também pela uniformização do tipo de amostra para as diferentes análises que são requisitadas ao laboratório.

Até à chegada deste teste, todas as análises requisitadas aos Laboratórios de Virologia e de Biologia Molecular do SSMT dos HUC, EPE, poderiam ser executadas com colheitas de soro. Depois para pedir colheitas de plasma exclusivamente para este teste seria algo complicado, dada a complexidade do processo referido anteriormente. Existem ainda inconvenientes para se proceder a colheitas de plasma: a) algumas análises não podem ser executadas em plasma (e.g. teste para pesquisa de Acs para o HTLV I/II da Abbott® no equipamento Architect®); b) a menor dimensão dos tubos de colheita de plasma (face aos de soro) tradicionalmente usados no hospital, requereriam que se procedesse a colheitas de 2-3 tubos por amostra (com conseqüente acréscimo de custos de material).

Esta validação interna é pois muito importante e necessária para se poder utilizar os resultados de amostras colhidas em soro e para que estes resultados sejam credíveis de acordo com as normas de certificação e acreditação para a garantia de qualidade num laboratório de biologia molecular.

A validação é definida como um o processo pelo qual a comunidade científica adquire as informações necessárias para:

- a) Avaliar a capacidade de um procedimento para obter resultados confiáveis.
- b) Determinar as condições em que tais resultados podem ser obtidos.
- c) Definir as limitações do procedimento.

O processo de validação identifica aspectos de um processo que são críticos e devem ser cuidadosamente controlados e vigiados (SWGDM, 2004).

De acordo com as directrizes publicadas pela “Scientific Working Group on DNA Analysis Methods” (SWGDM), o processo de validação interna deve incluir estudos abrangendo um total de pelo menos 50 amostras.

Os parâmetros de validação de um método devem obedecer a critérios definidos pelo “International Conference on Harmonization” (ICH) e outras agências de todo o

mundo para avaliar métodos analíticos: selectividade /especificidade, exactidão, precisão, linearidade, limite de detecção e de quantificação, reprodutibilidade, robustez e estabilidade (SWGDM, 2004; Araújo, 2009; Bustin et al., 2009; FDA, 2009).

Assim, a validação interna de amostras de soro por PCR-RT do teste Cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan® HBV deve evidenciar os parâmetros referidos anteriormente, quando se proceder à comparação dos resultados das cargas virais no soro com os resultados para as amostras de plasma, para o qual o teste já se encontra validado.

## **2.2 – Objectivos**

Uma vez que o teste Cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan® HBV foi validado apenas para utilização de plasma humano colhido no anticoagulante EDTA, pretende-se com este estudo comparar a carga viral do DNA do VHB em amostras de plasma *versus* soro, tendo como finalidade a validação interna dos resultados em amostras de soro.



## **CAPÍTULO III**

### **3 - Material e Métodos**

#### **3.1 - Local do Estudo**

A componente laboratorial e de investigação do estudo teve lugar no Laboratório de Biologia Molecular Doentes, do SSMT dos HUC, EPE, entre Outubro de 2008 e Maio de 2009.

#### **3.2 - Tipo de Estudo**

O estudo foi efectuado em colheitas de sangue periférico provenientes de indivíduos com infecção pelo VHB aguda ou crónica, activa ou não.

#### **3.3- Técnica de Amostragem e Dimensão da Amostra**

Não havendo um número mínimo da dimensão da amostra definido para este tipo de validação (há recomendações da SWGDAM de validação de 50 amostras, para estudos moleculares nas Ciências Forenses), foi enviado um “E-mail” à Roche Molecular Diagnostics que aconselhou um mínimo de 100 amostras (com diferentes cargas virais para o VHB) para a validação das amostras de soro.

Foi constituída uma população com 360 indivíduos: 111 do sexo feminino (31%) e 249 do sexo masculino (69%) com idades compreendidas entre os 17 e os 79 anos (média de 48,33).

A todos os indivíduos foram feitas 2 tipos de colheitas para obtenção de plasma e de soro: para plasma foram feitas colheitas para tubos Vacuette® de 5ml com uma solução de anticoagulante K<sub>3</sub>EDTA a 8% (o EDTA liga-se aos iões cálcio bloqueando a cascata de coagulação) e para obtenção de soro foram feitas colheitas para tubos da Vacuette® de 8ml sem anticoagulante, mas com acelerador de coagulação e esferas. Estes tubos são revestidos internamente com partículas de sílica micronizada, as quais activam a

coagulação quando os tubos são gentilmente invertidos. As esferas são de poliestireno, as quais estão presentes no fundo do tubo. Estas têm densidade intermediária entre o coágulo e o soro. Durante a centrifugação, as esferas movem-se para cima posicionando-se entre o soro e o coágulo (<http://www.vacurette.com.br/produtos/tubos.htm>; <http://www.gbo.com/brasil/por/563.php>).

### **3.4 - Metodologia**

A todas as amostras, de soro e plasma, foi feita a determinação da carga viral do DNA do VHB, pelo teste Cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan HBV, pela técnica de PCR-RT, de acordo com as instruções do fabricante (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, EUA), descritas na bula.

#### **3.4.1. Procedimento**

##### **3.4.1.1. Princípio do procedimento:**

De acordo com o fabricante, o teste Cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan HBV é um teste de PCR em tempo real que se baseia em 2 processos principais: preparação da amostra para isolar o DNA do VHB (no instrumento Cobas® AmpliPrep) e na amplificação simultânea por PCR do DNA alvo e detecção de sonda de detecção oligonucleotídica duplamente marcada e clivada específica para o alvo (no autoanalisador Cobas® TaqMan).

O teste Cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan HBV permite a preparação automatizada das amostras seguida da amplificação e detecção automatizadas por PCR do DNA alvo para o VHB e do DNA do Padrão de Quantificação (PQ) do VHB. O reagente de mistura principal contém pares de iniciadores e sondas específicas para o DNA do VHB e do PQ do VHB.

A detecção do DNA amplificado é efectuada através de uma sonda oligonucleotídica duplamente marcada específica para o alvo e específica para o PQ, que permite a identificação independente do amplicon e do amplicon do PQ do VHB.

A quantificação do DNA viral do VHB é realizada utilizando o PQ do VHB. Compensa os efeitos de inibição e controla os processos de preparação e amplificação, visando permitir uma quantificação mais rigorosa do DNA do VHB presente em cada amostra. Trata-se de uma estrutura de DNA não infeccioso que contém sequências de VHB com locais de ligação ao iniciador idênticos aos do DNA alvo e uma região única de ligação da sonda que permite que o amplicon do PQ do VHB se distinga do amplicon do VHB. O PQ do VHB é incorporado em cada amostra a um número conhecido de cópias e é submetido aos passos de preparação da amostra subsequentes, amplificação por PCR simultânea e detecção das sondas de detecção oligonucleotídicas duplamente marcadas e clivadas.

O analisador Cobas TaqMan calcula os níveis de DNA do VHB presentes nas amostras de teste, comparando o sinal do VHB com o sinal do PQ do VHB em cada amostra e controlo e que poderão ser visualizados no Cobas Amplilink (software).

#### **3.4.1.2. Equipamentos**

- COBAS AmpliPrep
- Analisador COBAS TaqMan 48
- Computador com o software Cobas Amplilink
- Câmara de fluxo laminar
- Vórtex
- Centrífuga Rotanta®

#### **3.4.1.3. Materiais e Reagentes**

##### **a) Kit COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test para 48 Testes**

(P/N: 03587819 190):

- HBV CS1 1 x 48 Testes: (Cassete de Reagente de Partículas Magnéticas de Vidro HBV)

Partículas magnéticas de vidro

- HBV CS2 1 x 48 Testes: (Cassete de Reagente de Lise do HBV)
- HBV CS3 1 x 48 Testes: Cassete Multi-Reagente de HBV contendo: Pase (Solução de Proteinase) 1 x 3,8 ml e EB 1 x 7,0 ml (Tampão de Eluição)

- HBV CS4 1 x 48 Testes: Cassete de Reagente Específica de Teste HBV contendo: HBV - QS 1 x 3,6 ml (Padrão de Quantificação do HBV); HBV MMX 1 x 2,5 ml (Mistura Principal HBV) e HBV Mn2+ 1 x 19,8 ml (Solução de Manganésio HBV)
- HBV H(+)C 4 x 1,0 ml: (Controlo Positivo Alto do HBV)
- HBV L(+)C 4 x 1,0 ml: (Controlo Positivo Baixo do HBV)
- CTM (–) C 4 x 1,0 ml [Controlo Negativo (Plasma Humano) COBAS TaqMan]
- HBV H(+)C Clip 1 x 4 Clipes (Clipe de Códigos de Barras de Controlo Positivo Alto do HBV)
- HBV L(+)C Clip 1 x 4 Clipes (Clipe de Códigos de Barras de Controlo Positivo Baixo do HBV)
- HBV (–) C Clip 1 x 4 Clipes (Clipe de Códigos de Barras de Controlo Negativo do HBV)

Cada dispositivo contém reagentes suficientes para 48 testes. Deve-se incluir pelo menos uma réplica de cada de CTM (–) C, HBV L(+)C e HBV H(+)C em cada ensaio.

**b) PG WR:** Reagente de Lavagem COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan - 1 x 5,1 l

**c) Outro Material Cobas® Ampliprep/ Cobas® TaqMan:**

- Tubos de entrada para amostras (tubos-S)
- Suporte tubos-S
- SPU's
- Suporte de SPU's
- Tubos-K
- Pontas- K
- portador-K
- Suporte para portador-K
- Clipes de etiqueta de código de barras
- Suportes para reagentes

**d) Outro material não fornecido**

- Micropipeta calibrada para 1000 µl

- Pontas com barreira para aerossóis de 1000 µl
- Luvas estéreis isentas de pó
- Tubos de polipropileno de 4-5ml com rolha
- Suporte para tubos de tubos de polipropileno de 4-5ml
- Tubos de 2ml para seroteca
- Pipetas de Pasteur estéreis

#### **3.4.1.4. Preparação da Amostra**

**a) Amostras de soro** (Sangue colhido em tubos estéreis de 8 ml, sem anticoagulante ou em tubos de preparação de soro com acelerador de coagulação).

- Deixar que o sangue coagule à temperatura ambiente.
- Centrifugar no prazo máximo de 4 horas, após a colheita, a cerca de 2680 r.p.m. durante 10-15 min para separar o soro das células.
- Etiquetar os tubos a utilizar para execução das análises pedidas (tubos-teste de polipropileno de 4-5 ml) e um tubo para a seroteca do VHB (tubos de 2ml).
- Retirar o soro com uma pipeta de Pasteur estéril, distribuindo este para os respectivos tubos estéreis (tubos-teste + tubo para seroteca do VHB).
- Rolhar os tubos e armazenar de acordo com o ponto 6.

**b) Amostras de plasma** (sangue colhido em tubos estéreis de 5ml contendo EDTA).

- Armazenar o sangue total à temperatura ambiente até um máximo de 4 horas. Não refrigerar.
- Centrifugar no prazo máximo de 4 horas, após a colheita, a cerca de 1000g durante 10-15 min para separar o plasma das células.
- Etiquetar os tubos a utilizar para execução das análises pedidas (tubos-teste de polipropileno de 4-5 ml) e para a seroteca do VHB (tubos de 2ml).
- Retirar o soro com uma pipeta de Pasteur estéril, distribuindo este para os respectivos tubos estéreis (tubo-teste + tubo para seroteca de VHB).
- Rolhar os tubos e armazenar de acordo com a alínea d.

### **c) Transporte da amostra**

O transporte de sangue total ou plasma deve obedecer às regulamentações nacionais e locais relativas ao transporte de agentes etiológicos.

O sangue total tem de ser transportado entre 2 e 25°C e centrifugado de acordo com o procedimento da amostra. O plasma e/ou o soro podem ser transportado entre 2 e 8°C ou congelados entre -20°C e -80°C.

### **d) Armazenamento das amostras**

- Armazenar as amostras a uma temperatura entre -60 e -80 °C.

Eventualmente, antes desta congelação, poderão ser inicialmente armazenadas entre 2 e 8°C, durante 48 horas, ou num congelador “no frost” a -20±5°C durante 72h.

- Colocar os tubos nos respectivos suportes: suportes-testes e suporte para seroteca do VHB.

- Descongelar apenas quando for utilizar. As amostras de plasma podem ser congeladas e descongeladas até um número máximo de cinco vezes sem perda de DNA do VHB.

### **3.4.1.5. Modo Operatório**

Todos os passos do procedimento podem ser consultados no Manual do Instrumento COBAS AmpliPrep para utilização com o Analisador COBAS TaqMan 48 e o Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1.0.

O processamento no Analisador COBAS TaqMan 48 tem que ser iniciado no prazo de 120 minutos após a conclusão da preparação da amostra e controlo no Cobas Ampliprep.

### **Configuração do COBAS AmpliPrep**

#### **Parte A. Manutenção e Purga**

A1. O Instrumento COBAS AmpliPrep está pronto para funcionar em modo de espera (“stand-by”).

A2. Ligar a estação de dados do software AMPLILINK (“ON”). Preparar a estação de dados da seguinte forma:

- a. Entrar no sistema Windows®.
- b. Clicar duas vezes no ícone do software AMPLILINK.
- c. Entrar no software AMPLILINK introduzindo a identificação de utilizador e a palavra de passe.

A3. Verificar a quantidade do PG WR através do ecrã Status e substitua, caso seja necessário.

A4. Realizar toda a manutenção que está enumerada na “Due Tab” (Tabulação Devida). O instrumento COBAS AmpliPrep preparará automaticamente o sistema.

### **Parte B. Carga das Cassetes de Reagente**

Nota: Todas as cassetes de reagente devem ser retiradas do armazenamento entre 2-8°C e carregadas imediatamente no Instrumento COBAS AmpliPrep e deixadas equilibrar à temperatura ambiente no instrumento pelo menos 30 minutos antes que a primeira amostra estiver para ser processada. Não deixar que as cassetes de reagente atinjam a temperatura ambiente fora do instrumento, dado que se pode formar condensação nas etiquetas com códigos de barras. Não limpar a condensação caso esta apareça nas etiquetas com códigos de barras.

B1. Colocar HBV CS1 num suporte de reagentes. Coloque HBV CS2, HBV CS3 e HBV CS4 num suporte de reagentes diferente.

B2. Carregar o suporte de reagentes contendo HBV CS1 na posição A do suporte do Instrumento COBAS AmpliPrep.

B3. Carregar o suporte de reagentes contendo HBV CS2, HBV CS3 e HBV CS4 na posição B, C, D ou E do suporte do Instrumento COBAS AmpliPrep.

### **Parte C. Carga de Descartáveis**

Nota: Determinar o número de cassetes de reagente COBAS AmpliPrep, de unidades de processamento de amostras (SPUs), tubos de entrada para amostras (tubos-S), pontas- K e tubos-K necessários. Para cada amostra ou controlo são necessários: uma SPU, um tubo-S de entrada, uma ponta-K e um tubo-K. Dependendo da configuração utilizada, carregar o número adequado de suportes de cassetes de reagentes, suportes de amostra com



tubos-S de entrada, suportes de SPU, suportes de pontas-K, suportes de tubos-K e portadores-K em suportes de transportadores-K nas posições do suporte respectivas do Instrumento COBAS AmpliPrep.

C1. Colocar as SPUs no suporte e carregar o suporte ou suportes na posição J, K ou L do Instrumento COBAS AmpliPrep.

C2. Dependendo da configuração utilizada, carregar o suporte ou suportes completos de tubos-K na posição M, N, O ou P do Instrumento COBAS AmpliPrep.

C3. Carregar o suporte ou suportes completos de pontas-K na posição M, N, O ou P do suporte do Instrumento COBAS AmpliPrep.

C4. Para as configurações 3 ou 5 utilizando o Analisador COBAS TaqMan 48, carregar os portadores-K no suporte ou suportes de portadores-K na posição M, N, O ou P do Instrumento COBAS AmpliPrep.

#### **Parte D. Carga e Pedido de Amostras**

D1. Preparar suportes de amostra da seguinte forma:

Prender um clipe de etiqueta de código de barras a cada posição de amostra no suporte onde se deverá colocar uma amostra (no tubo-S). Prender um dos cliques de etiqueta com códigos de barras específico para os controlos [CTM (-) C, HBV L(+)C e HBV H(+)C] para cada posição do suporte de amostras onde serão colocados os controlos (tubo-S). Os cliques com etiqueta com códigos de barras para os controlos devem ter o mesmo número de lote de controlo do que o número de lote presente nos frascos de controlo do dispositivo. Usar de precaução para atribuir o controlo adequado à posição com o clipe de códigos de barras de controlo adequado. Colocar um tubo-S de entrada em cada posição contendo um clipe de etiqueta de código de barras.

D2. Utilizando o software AMPLILINK, criar pedidos de amostras para cada amostra na janela “Orders”, pasta “Sample”. O nome do ficheiro de Teste na janela “Orders” será HBMCAP48.

D3. Atribuir pedidos de amostra e controlo às posições do suporte de amostras na janela “Orders”, pasta “Sample Rack”. O número do suporte de amostras deve ser para o suporte preparado no passo D1.

D4. Imprimir o relatório “Sample Rack Order” para utilizar como uma folha de trabalho.

D5. Preparar suportes de amostra e controlo na área designada para a adição de amostras e controlos (numa câmara de fluxo laminar), da seguinte forma: homogeneizar num vórtex cada amostra e controlo [CTM (-) C, HBV L(+)C e HBV H(+)C] durante 3 a 5 segundos. Evitar contaminar as luvas enquanto manipular as amostras e controlos.

D6. Pipetar 1000 µl de cada amostra e controlo [CTM (-) C, HBV L(+)C e HBV H(+)C] para o tubo-S de entrada identificado com o código de barras adequado evitando transferir partículas e/ou coágulos de fibrina da amostra original para o tubo-S de entrada.

D7. Carregar o suporte ou suportes de amostra com tubos-S de Entrada e tubos-K (um para cada tubo-S de Entrada, carregado na posição da direita adjacente aos tubos-S de entrada) na posição do suporte F, G ou H do Instrumento COBAS AmpliPrep.

#### **Parte E. Início do Processamento no Instrumento COBAS AmpliPrep**

E1. Clicar em “start” no Instrumento COBAS AmpliPrep utilizando o software AMPLILINK.

#### **Parte F. Final do Processamento com o Instrumento COBAS AmpliPrep e Transferência para o Analisador COBAS TaqMan 48**

F1. Verificar se existem indicadores ou mensagens de erro no ecrã do sistema.

F2. Retirar as amostras e controlos processados do Instrumento COBAS AmpliPrep em suportes portador-K para o Analisador COBAS TaqMan 48.

F3. Retirar os detritos do Instrumento COBAS AmpliPrep.

Nota: Todas as amostras e controlos processados não devem ser expostas à luz depois da conclusão da preparação da amostra e controlo.

#### **F4. Amplificação e Detecção**

Configuração do Analisador COBAS TaqMan 48. O processamento no Analisador COBAS TaqMan 48 tem que ser iniciado no prazo de 120 minutos após a conclusão da preparação da amostra e controlo.

### **Parte G. Carga de Amostras Processadas**

G1. Executar os passos adequados para transferir os tubos- K para Analisador COBAS TaqMan 48: transferência manual de portadores-K para o Analisador COBAS TaqMan 48 utilizando o Transportador portador-K.

### **Parte H. Início do Processamento no Analisador COBAS TaqMan**

H1. Ligar o Analisador COBAS TaqMan 48 tendo o cuidado de encher o portador-K com tubos-K vazios se existirem menos de 6 tubos- K no portador. O enchimento é orientado pelo software AMPLILINK. Abrir o termociclador, carregar o portador-K no termociclador e fechar a tampa. Iniciar o processamento no Analisador COBAS TaqMan 48.

### **Parte I. Final do Processamento no Analisador COBAS TaqMan**

I1. Após a conclusão do processamento no Analisador COBAS TaqMan 48, imprimir o Relatório dos Resultados. Verificar se existem indicadores ou mensagens de erro no relatório de Resultados. As amostras com indicadores e comentários são interpretadas conforme descrito na secção Resultados. Depois de os aceitar, armazenar os dados no arquivo.

I2. Remover os tubos-K usados do Analisador COBAS TaqMan 48.

### **3.4.2. Cálculo e Expressão dos Resultados**

O Analisador COBAS TaqMan 48 determina automaticamente a concentração de ADN do HBV para as amostras e controlos.

A concentração de DNA do VHB é expressa em Unidades Internacionais: UI/ml. O factor de conversão entre cópias/ml e UI/ml do HBV é 5,82 cópias/UI utilizando o Padrão Internacional da OMS para o DNA do vírus da Hepatite B para Testes com Ensaio de Tecnologia de Ácidos Nucleicos. Se for necessário, os resultados podem ser convertidos manualmente para cópias/ml, utilizando o cálculo de conversão, da seguinte forma:

Concentração de DNA do VHB em UI/ml x 5,82 cópias/UI = DNA do VHB em cópias/ml

Exemplo: 1,23E+04 UI/ml x 5,82 cópias/UI = 7,16E+04 cópias/ml.

#### **- Software AMPLILINK:**

- Determinar o valor de limite do ciclo (Ct) para o DNA do HBV e para o DNA do PQ do HBV.
- Determinar a concentração de DNA do HBV com base nos valores de Ct para o DNA do HBV e para o ADN do PQ do HBV e os coeficientes de calibragem específicos para o lote fornecidos nos códigos de barras da cassette.
- Determinar que as UI/ml calculadas para HBV L(+)C e HBV H(+)C se encontram dentro dos limites atribuídos.

#### **- Validação do Lote**

Examinar a janela de resultados do software AMPLILINK ou o impresso para procurar indicadores e comentários para assegurar que o lote é válido.

Para pedidos de controlo, é feita uma verificação para determinar se o valor de UI/ml para o controlo está dentro do seu intervalo especificado. Se o valor de UI/ml para o controlo cair fora do seu intervalo, é produzido um indicador (“FLAG”) para mostrar que o controlo falhou. O lote é válido se não aparecer nenhum indicador para nenhum dos controlos [HBV L(+)C, HBV H(+)C e CTM (–) C].

Caso o lote seja inválido, repetir todo o lote, incluindo preparação, amplificação e detecção da amostra e do controlo.

#### **- Interpretação dos Resultados:**

Para um lote válido, verifique cada amostra individual para indicadores ou comentários na impressão dos resultados (anexos 2 e 3).

Os resultados são interpretados de acordo com as instruções do fabricante (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, EUA), descritas na bula (Tab. 5).

**Tabela 5: Interpretação dos resultados obtidos por PCR-RT no Cobas TaqMan**

Resultado do Título	Interpretação
Target Not Detected	Valor de Ct para HBV acima do limite para o ensaio ou nenhum valor de Ct para HBV obtido. Reporte os resultados como “ADN do HBV não detectado”.
< 1.20E+01 IU/mL	UI/ml calculadas encontram-se abaixo do Limite de Detecção do ensaio. Reporte os resultados como “ADN do HBV detectado, menos de 12 UI/ml de ADN do HBV”
$\geq 1.20E+01$ IU/mL e < 5.45E+01 IU/mL	Os resultados IU/ml calculados são inferiores ao Limite Inferior do Intervalo Linear do teste. Estes resultados possuem um elevado grau de variabilidade, não podendo por isso ser considerados precisos. Estes resultados devem ser interpretados com cuidado.
$\geq 5.45E+01$ IU/mL e $\leq 1.10E+08$ IU/mL	Os resultados calculados superiores ou iguais a 54,5 IU/ml e inferiores ou iguais a 1,10E+08 IU/ml estão dentro do Intervalo Linear do teste.
> 1.10E+08 IU/mL	UI/ml calculadas encontram-se acima do limite do ensaio. Reporte os resultados como “superior a 1,10E+08 UI/ml de ADN do HBV.” Se forem desejados resultados quantitativos a amostra original deve ser diluída com plasma EDTA humano negativo para HBV e o teste repetido. Multiplique o resultado reportado pelo factor de diluição.

Um lote válido pode incluir resultados de amostras válidos e inválidos dependendo do facto de serem obtidos indicadores e/ou comentários para as amostras individuais.

### 3.5. Tratamento Estatístico de Dados

Os resultados foram analisados estatisticamente recorrendo ao programa Excel do Windows Vista (Microsoft Corporation), para cálculo de percentagens e médias (sexo e idade, respectivamente). Também se utilizou um gráfico deste para visualizar e comparar os resultados obtidos nos ciclos de Congelamento-Descongelamento, dado que não foi possível efectuar o tratamento estatístico nestas amostras.

Recorrendo ao software SPSS® para Windows (SPSS, Inc.) efectuaram-se testes não paramétricos (Qui-quadrado) e testes paramétricos como o teste t de Student para amostras independentes e o teste r de Pearson (com valores entre 0 e 1, entendendo-se que quanto mais próxima de 1, mais perfeita é a correlação) para cálculo de significância e/ou correlação entre os resultados dos indivíduos em duas variáveis (plasma e soro). Considerou-se que as diferenças seriam estatisticamente significativas quando  $p \leq 0,05$ .

## **CAPÍTULO IV**

## 4 - Resultados

Da análise das cargas virais obtiveram-se resultados entre “não detectável” e valores de 990751700 UI/ml (Anexo 4). Estes resultados permitiram organizar as amostras de soro e plasma de 360 indivíduos em 7 classes logarítmicas:

- . “0 log”: entre 0 e 9<sup>#</sup> UI/ml
- . 1 log: entre 10 e 99 UI/ml
- . 2 log: entre 100 e 999 UI/ml
- . 3 log: entre 1000 e 9999 UI/ml
- . 4 log: entre 10000 e 99999 UI/ml
- . 5 log : entre 100000 e 999999 UI/ml
- . 6 log: entre 1000000 e 9999999 UI/ml
- . 7 log: entre 10000000 e 990751700\*UI/ml

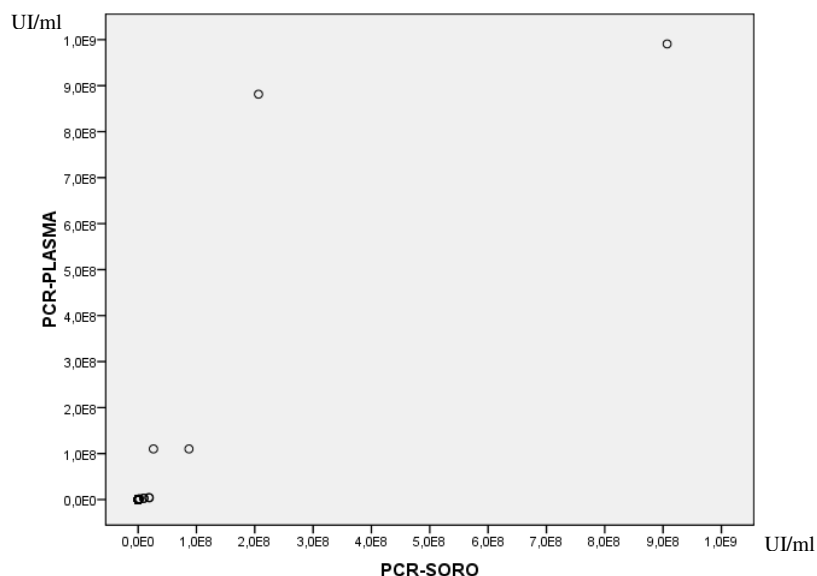
<sup>#</sup>O grupo “0 log” inclui as cargas virais indetectáveis e cargas virais <12 UI/ml às quais foram atribuídos os valores 0 UI/ml e 6UI/ml, respectivamente.

\* O grupo 7 log de 4 indivíduos, inclui cargas virais de 7 log e de 8 log.

### 4.1. Resultados obtidos para a totalidade de cargas virais de plasma e soro

Os resultados relativos a cargas virais de plasma e soro no grupo na totalidade das amostras encontram-se no Gráfico 1 e Tabela 6.

O gráfico 1 mostra de que, de um modo geral e aparentemente, existe uma correlação estatisticamente significativa entre a totalidade das amostras de plasma e de soro com cargas virais de diferentes logs.



**Gráfico 1 – Correlação entre as cargas virais da totalidade das amostras de plasma e de soro**

**Tabela 6: Coeficiente de Pearson entre a totalidade das cargas virais do plasma e do soro**

		PCR-SORO
PCR-PLASMA	Pearson Correlation - r	0,875**
	Sig. (2-tailed) - p	0,000
	n	360

\*\*Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Comparando a carga viral das amostras de plasma com as amostras de soro, verifica-se que para cargas mais elevadas de plasma também se verificam cargas virais de soro mais elevadas, existindo assim correlação entre as duas variáveis, com um coeficiente r de Pearson de 0,875, um coeficiente de variação de 0,765 ( $\approx 77\%$ ) e  $p < 0,001$ .

#### **4.2. Resultados obtidos para cargas virais de plasma e soro no grupo “0 log”**

Os resultados relativos a cargas virais de plasma e de soro no grupo “0 log” encontram-se tratados na Tabela 7.



**Tabela 7: Coeficiente de Pearson entre as cargas virais do plasma e do soro no grupo “0 log”**

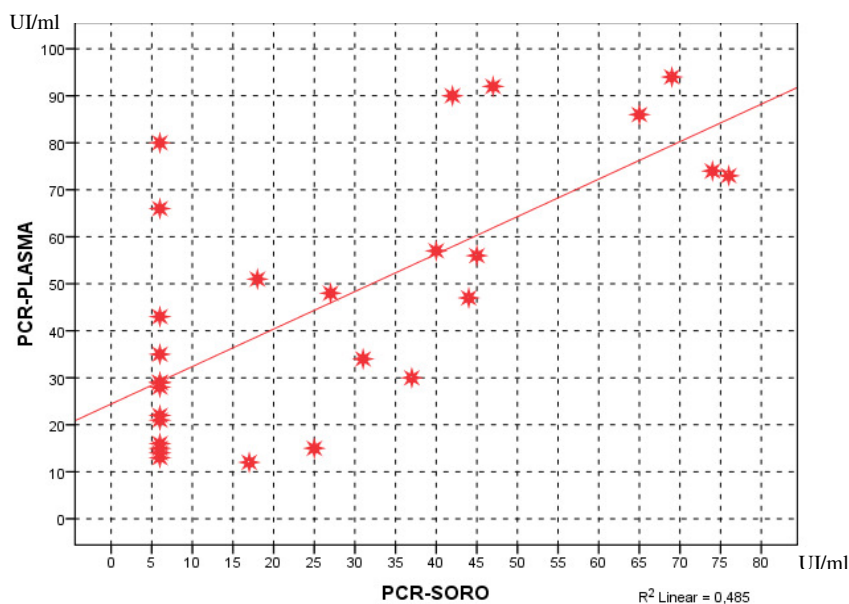
Log			PCR-SORO
“0 log”	PCR-PLASMA	Pearson Correlation – r	0,339**
		Sig. (2-tailed) - p	0,000
		n	133

\*\*Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Apesar de se verificar uma diminuição da correlação entre as cargas virais de plasma e de soro relativamente aos restantes logs, para estes 133 indivíduos do grupo “0 log”, o coeficiente r de Pearson é de 0,339 existindo assim fraca correlação (cerca de 12%) entre as duas variáveis, mas ainda assim é positiva.

#### 4.3. Resultados obtidos para cargas virais de plasma e soro no grupo 1 log

Os resultados relativos a cargas virais de plasma e de soro no grupo 1log encontram-se no Gráfico 2 e Tabela 8.



**Gráfico 2 – Correlação entre as amostras de plasma e de soro no grupo 1log**

**Tabela 8: Coeficiente de Pearson entre as cargas virais do plasma e do soro no grupo 1log**

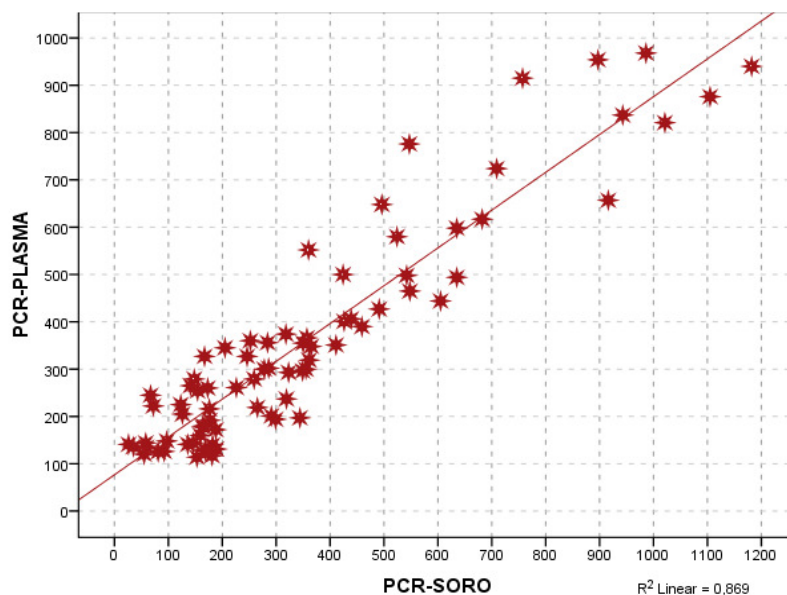
Log			PCR-SORO
1 log	PCR-PLASMA	Pearson Correlation - r	0,696**
		Sig. (2-tailed) - p	0,000
		n	28

\*\*Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Observa-se uma boa correlação de cerca de 49% entre as cargas virais de plasma e de soro no grupo 1 log, de 28 indivíduos, sendo o coeficiente r de Pearson de 0,696.

#### 4.4. Resultados obtidos para cargas virais de plasma e soro no grupo 2 log

Os resultados relativos a cargas virais de plasma e soro no grupo 2 log encontram-se no Gráfico 3 e Tabela 9.



**Gráfico 3 – Correlação entre as amostras de plasma e de soro no grupo 2 log**

**Tabela 9: Coeficiente de Pearson entre as cargas virais do plasma e do soro no 2 log**

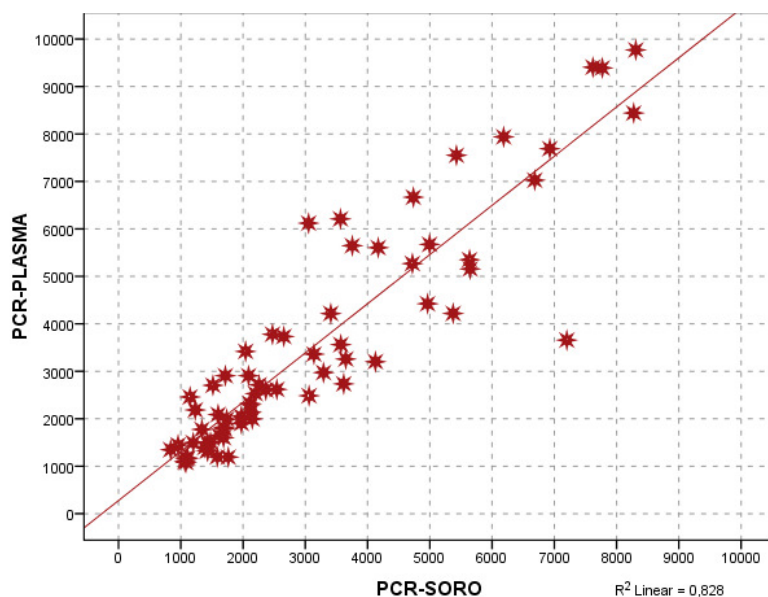
Log			PCR-SORO
2 log	PCR-PLASMA	Pearson Correlation - r	0,932**
		Sig. (2-tailed) - p	0,000
		n	77

\*\*Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

Existe uma óptima correlação de cerca de 87% entre as cargas virais de plasma e de soro no log 2, para este grupo de 77 indivíduos, sendo o coeficiente r de Pearson de 0,932 e  $p < 0,001$ .

#### 4.5. Resultados obtidos para cargas virais de plasma e soro no grupo 3 log

Os resultados relativos a cargas virais de plasma e soro no grupo 3 log encontram-se no Gráfico 4 e Tabela 10.



**Gráfico 4 – Correlação entre as amostras de plasma e de soro no grupo 3 log**

**Tabela 10: Coeficiente de Pearson entre as cargas virais do plasma e do soro no grupo 3 log**

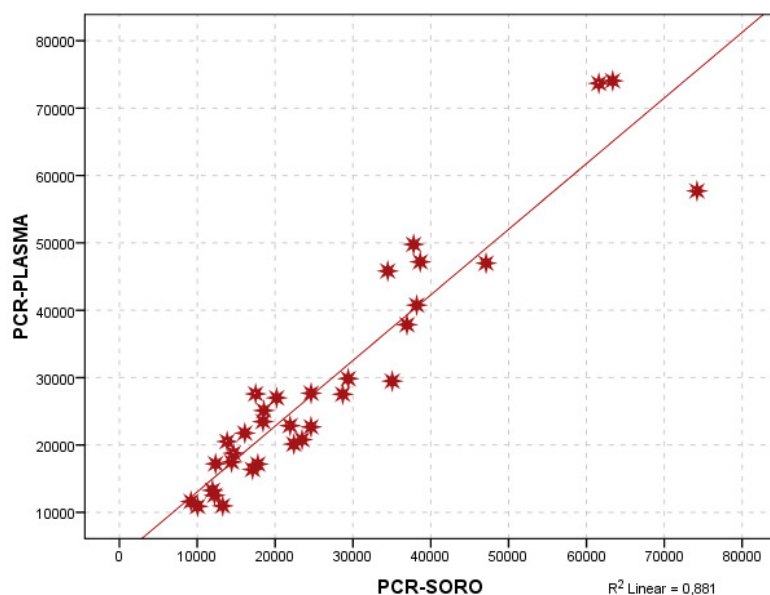
Log			PCR-SORO
3 log	PCR-PLASMA	Pearson Correlation - r	0,910**
		Sig. (2-tailed) - p	0,000
		n	68

\*\*Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

Existe uma óptima correlação de cerca de 83% entre as cargas virais de plasma e de soro no grupo 3 log, de 68 indivíduos, sendo o coeficiente de Pearson de 0,910.

#### 4.6. Resultados obtidos para cargas virais de plasma e soro no grupo 4 log

Os resultados relativos a cargas virais de plasma e soro no grupo 4 log encontram-se no Gráfico 5 e Tabela 11.



**Gráfico 5 – Correlação entre as amostras de plasma e de soro no grupo 4 log**

**Tabela 11: Coeficiente de Pearson entre as cargas virais do plasma e do soro no grupo 4 log**

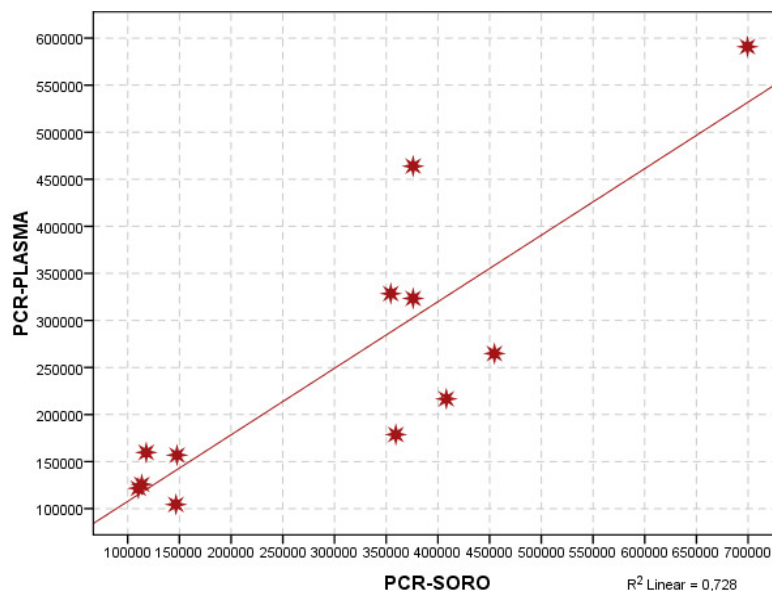
Log			PCR-SORO
4 log	PCR-PLASMA	Pearson Correlation	0,939**
		Sig. (2-tailed)	0,000
		N	33

\*\*Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

Existe uma óptima correlação de cerca de 88% entre as cargas virais de plasma e de soro no grupo 4 log, de 33 indivíduos, sendo o coeficiente r de Pearson de 0,939.

#### 4.7. Resultados obtidos para cargas virais de plasma e soro no grupo 5 log

Os resultados relativos a cargas virais de plasma e soro no grupo 5 log encontram-se no Gráfico 6 e Tabela 12.



**Gráfico 6 – Correlação entre as amostras de plasma e de soro no grupo 5 log**

**Tabela12: Coeficiente de Pearson entre as cargas virais do plasma e do soro no grupo 5 log**

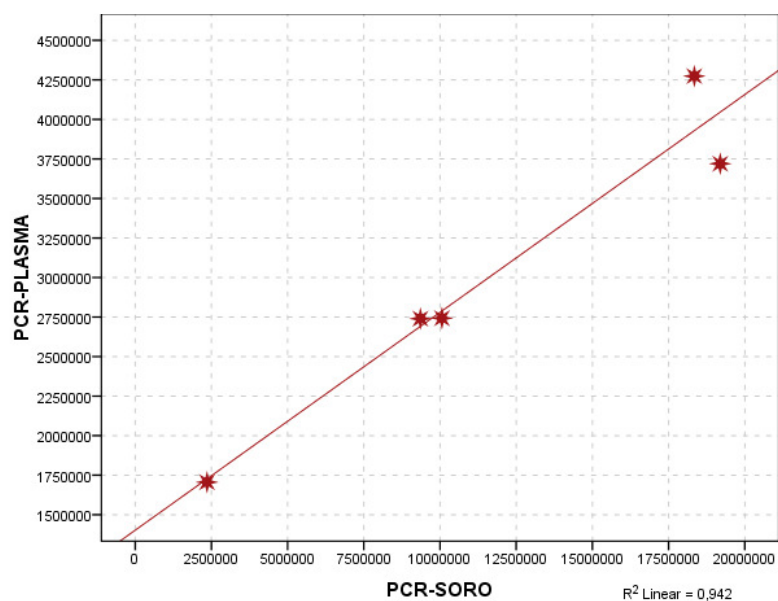
Log			PCR-SORO
5 log	PCR-PLASMA	Pearson Correlation	0,853**
		Sig. (2-tailed)	0,000
		N	12

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

Existe uma óptima correlação de cerca de 73% entre as cargas virais de plasma e de soro no grupo 5 log, de 12 indivíduos, sendo o coeficiente de Pearson de 0,853.

#### 4.8. Resultados obtidos para cargas virais de plasma e soro no grupo 6 log

Os resultados relativos a cargas virais de plasma e soro no grupo 6 log encontram-se no Gráfico 7 e Tabela 13.



**Gráfico 7 – Correlação entre as amostras de plasma e de soro no grupo 6 log**

**Tabela 13: Coeficiente de Pearson entre as cargas virais do plasma e do soro no grupo 6 log**

Log			PCR-SORO
6 log	PCR-PLASMA	Pearson Correlation - r	0,970**
		Sig. (2-tailed) - p	0,006
		n	5

\*\*Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

Existe uma correlação quase perfeita de cerca de 94% entre as cargas virais de plasma e de soro no grupo 6 log, de 5 indivíduos, sendo o coeficiente de Pearson de 0,970.

#### 4.9. Resultados obtidos para cargas virais de plasma e soro no grupo 7 log

Os resultados relativos a cargas virais de plasma e soro no grupo 7 log encontram-se na Tabela 14.

**Tabela 14: Coeficiente de Pearson entre as cargas virais do plasma e do soro no grupo 7 log**

Log			PCR-PLASMA	PCR-SORO
7 log	PCR-PLASMA	Pearson Correlation - r	1	0,771
		Sig. (2-tailed) - p		0,229
		n	4	4

Existe uma correlação de cerca de 59% entre as cargas virais de plasma e de soro no grupo 7 log, de 4 indivíduos, sendo o coeficiente de Pearson de 0,771. Contudo não se obteve uma diferença estatisticamente significativa com um  $p = 0,229$  ( $p > 0,05$ ).

#### 4.10. Resultados totais obtidos para cargas virais de plasma e soro, pelo teste Coeficiente de Relação Intraclass

Os resultados totais obtidos para cargas virais de plasma e soro, pelo teste Coeficiente de Relação Intraclass encontram-se na Tabela 15.

**Tabela 15: Coeficiente de relação intraclass entre as cargas virais do plasma e do soro**

	Intraclass Correlation <sup>a</sup>	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
Single Measures	<b>0,822<sup>b</sup></b>	0,786	0,853
Average Measures	0,902 <sup>c</sup>	0,880	0,921

Avaliando a concordância e consistência dos valores das cargas virais de plasma e de soro obteve-se um bom coeficiente interclasses de 0,822.

#### 4.11. Resultados obtidos para cargas virais de plasma e soro em função do sexo dos indivíduos avaliados pelo teste T de student

Os resultados obtidos para cargas virais de plasma e soro em função do sexo dos indivíduos, encontram-se nas tabelas 16 e 17.

**Tabela 16: Análise das cargas virais de plasma e de soro em função do sexo dos indivíduos**

	gênero	n	Mean	Std. Deviation
PCR-PLASMA	Feminino	111	8958280,41	9,404E7
	Masculino	249	4487103,39	5,666E7
PCR-SORO	Feminino	111	8264762,33	8,608E7
	Masculino	249	1500366,90	1,436E7



**Tabela 17: Análise das cargas virais de plasma e de soro em função do sexo dos indivíduos pelo teste T de student , para amostras independentes**

		t-test for Equality of Means		
		Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference
PCR-PLASMA	Equal variances assumed	0,578	4471177,020	8022286,864
	Equal variances not assumed	0,643	4471177,020	9620639,952
PCR-SORO	Equal variances assumed	0,229	6764395,438	5613818,201
	Equal variances not assumed	0,412	6764395,438	8220827,686

Para o sexo feminino (n=111) verificaram-se cargas virais no plasma mais elevadas, o que também se verificou em relação às cargas virais do soro, e ambas se mostraram relativamente mais elevadas do que as cargas virais obtidas para o sexo masculino, não havendo diferença significativa entre as cargas virais de plasma e de soro dentro de cada um dos grupos. Quando comparamos dentro das cargas virais do plasma e das cargas virais do soro, a variável sexo, verificamos que não existe uma diferença significativa, com um  $p=0,575$  e  $p=0,229$ , respectivamente.

#### **4.12. Resultados obtidos para cargas virais de plasma e soro em função da idade dos indivíduos avaliados pelo teste de Pearson**

Os resultados obtidos para cargas virais de plasma e soro em função da idade dos indivíduos avaliados pelo teste de Pearson, encontram-se na tabela 18.

**Tabela 18: Análise das cargas virais de plasma e de soro em função da idade dos indivíduos**

		PCR-PLASMA	PCR-SORO
IDADE	Pearson Correlation – r	0,069	0,101
	Sig. (2-tailed) - p	0,195	0,056
	n	360	360

Relativamente à idade dos indivíduos, verificou-se que não existe correlação entre as cargas virais do plasma (com  $p = 0,195$  ou seja  $p > 0,05$ ) e do soro (com  $p = 0,056$  ou seja  $p > 0,05$ ), pelo que as cargas virais obtidas não dependem da idade.

#### 4.13. Resultados obtidos para cargas virais de plasma e de soro em amostras positivas para HCV e/ou HIV (especificidade do teste)

Os resultados obtidos para cargas virais de plasma e de soro em amostras positivas para HCV e/ou HIV, encontram-se nas tabelas: 19 a 22.

**Tabela 19: Análise das cargas virais de plasma e de soro em função da hepatite C**

Group Statistics					
Hep_C		n	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
PCR-PLASMA	Negativo	350	6026409,63	7,122E7	3806720,465
	Positivo	10	241449,60	534404,673	168993,596
PCR-SORO	Negativo	350	3680063,61	4,992E7	2668166,398
	Positivo	10	295771,10	733095,925	231825,287

**Tabela 20: Análise das cargas virais de plasma e de soro em função da hepatite C**

Independent Samples Test				
		t-test for Equality of Means		
		Sig. (2-tailed) - p	Mean Difference	Std. Error Difference
PCR-PLASMA	Equal variances assumed	0,798	5784960,034	2,255E7
	Equal variances not assumed	0,130	5784960,034	3810469,726
PCR-SORO	Equal variances assumed	0,831	3384292,514	1,581E7
	Equal variances not assumed	0,207	3384292,514	2678218,604

Não existe uma diferença estatisticamente significativa entre a totalidade das cargas virais de plasma ( $p=0,798$ ) e das cargas virais de soro ( $p=0,831$ ) relativamente às amostras com hepatite C.

**Tabela 21: Análise dos casos de HVC e HIV positivos e negativos por “Cross-tabulation”**

			HIV		Total
			Positivo	Negativo	
Hep_C	Positivo	n	2	8	10
		% Hep_C	20,0%	80,0%	100,0%
		% of Total	0,6%	2,2%	2,8%
		Adjusted Residual	4,6	-4,6	
	Negativo	n	4	346	350
		% within Hep_C	1,1%	98,9%	100,0%
		% of Total	1,1%	96,1%	97,2%
		Adjusted Residual	-4,6	4,6	
Total	n	6	354	360	
	% Hep_C	1,7%	98,3%	100,0%	
	% of Total	1,7%	98,3%	100,0%	

**Tabela 22: Análise dos casos de HVC e HIV positivos e negativos pelo teste  $\chi^2$  - quadrado independente com aplicação do teste exacto de Fisher**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	21,094 <sup>a</sup>	1	0,000	0,010
Continuity Correction <sup>b</sup>	11,157	1	0,001	
Likelihood Ratio	7,296	1	0,007	
Fisher's Exact Test				
Linear-by-Linear Association	21,036	1	0,000	
n of Valid Cases	360			

Analisando as tabelas 21 e 22, constatou-se uma associação entre a presença/ausência de HCV e a presença/ausência de HIV ( $p < 0,01$ ). Efectivamente a maioria dos doentes do estudo revelou não ter hepatite C e/ou HIV. No entanto dos 6 doentes com HIV, 2 tinham também HCV. Atendendo que as 14 amostras positivas para HCV e/ou HIV, se encontravam no grupo “0 log” em amostras consideradas negativas para o VHB ( $n=133$ ), estamos perante uma especificidade de 90%. (119 verdadeiros negativos/133 total amostras negativas). Assim temos 90% de verdadeiros negativos de plasma e de soro em que HIV e/ou HCV positivos não interferem com os resultados da carga viral do VHB, com uma significância de 0,001.

#### 4.14. Resultados obtidos para réplicas de cargas virais de soro pelo teste T de student com amostras emparelhadas

Os resultados obtidos para réplicas de cargas virais de soro pelo teste T de student com amostras emparelhadas encontram-se nas tabelas 23 e 24.

**Tabela 23: Análise das médias das cargas virais das réplicas de soro sem diluição (1/1) e com e diluição (1/2)**

		Mean	n	Std. Deviation
Pair 1	Soro_orig	106,0000	7	149,41776
	Soro_1_1	107,0000	7	145,96004
Pair 2	Soro_orig	2812,2353	17	10746,01557
	Soro_1_2	2997,4118	17	11599,84292

**Tabela 24: Análise da correlação das réplicas de soro sem diluição (1/1) e com e diluição (1/2)**

Paired Samples Correlations						
		n	Correlation -r	Sig.	t	df
Pair 1	Soro_orig & Soro_1_1	7	0,994	0,000	0,164	6
Pair 2	Soro_orig & Soro_1_2	17	1,000	0,000	0,888	16

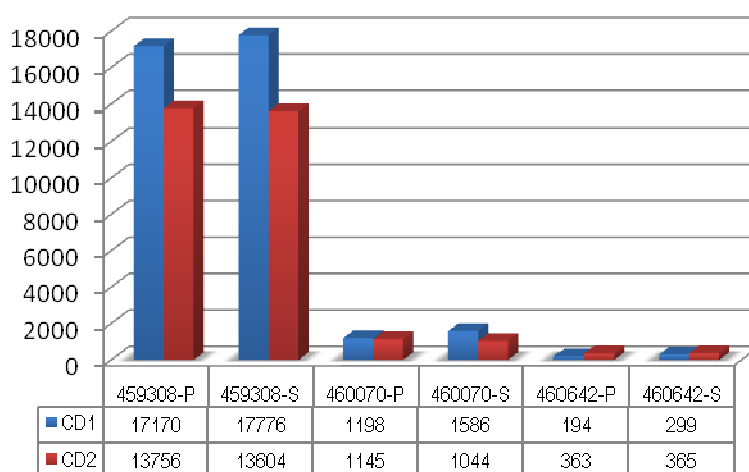
Analisando as duas tabelas anteriores, verificou-se uma correlação perfeita de 1, para cargas virais das 17 amostras de soro não diluídas e as cargas virais das réplicas

dessas amostras de soro diluídas a  $\frac{1}{2}$  (Pair2). Relativamente às 7 amostras que foram repetidas sem diluição a correlação é muito boa com um coeficiente de 0,994 com um coeficiente de variação de  $\approx 99\%$ .

#### 4.15. Resultados obtidos para estabilidade da carga viral após 2 ciclos de Congelamento-Descongelo

Os resultados obtidos para estabilidade da carga viral após 2 ciclos de Congelamento-Descongelo encontram-se no gráfico 8.

Como se trata de uma amostragem muito reduzida, de apenas 6 amostras com dois resultados cada, não foi possível proceder a análise estatística.



**Gráfico 8 - Estabilidade da carga viral (UI/ml) do VHB de 3 amostras (459308, 460070 e 460642) em plasma (P) e soro (S), após um máximo de 2 ciclos de Congelamento - Descongelo (C-D).**

Aparentemente mantém-se a correlação encontrada nos dois ciclos de C-D entre as cargas virais do plasma e as cargas virais do soro. Apesar de se verificar uma proximidade de valores entre soro e plasma nos dois ciclos de C-D, as cargas virais do soro são ligeiramente mais elevadas do que as cargas do plasma, no soro. Parece também existir uma tendência da carga viral aumentar no 2º ciclo de C-D à medida que baixam as concentrações das cargas virais.

## **Capítulo V**

## 5 – Discussão

A diferença da virémia do DNA do VHB obtida para as amostras de plasma e para as amostras de soro, por PCR-RT do teste Cobas® AmpliPrep / Cobas® TaqMan® HBV, tiveram, de um modo geral, um coeficiente de correlação bom.

Algumas notas a considerar:

1. Não se obteve uma diferença estatisticamente significativa no grupo 7 log ( $p=0,229$ ). Esta poderá ter como causa essencial a pequena dimensão do grupo ( $n=4$ ) que contem cargas virais nos 7 log e 8 log (cargas virais entre 10000000 e 990751700 UI/ml).
2. Em cargas virais mais baixas, verificou-se uma fraca correlação entre as cargas virais do plasma versus soro, aumentando a correlação à medida que também aumenta o log dos resultados. Uma excepção para o grupo 7 log, como referido anteriormente. A fraca correlação detectada para o grupo 0 log poderá ser explicada por neste grupo se ter optado por incluir os resultados indetectáveis (igual a 0) e os que apresentam cargas inferiores a 12UI (média 6).
3. Demonstrou-se uma **sensibilidade** do teste muito semelhante comparando cargas virais do plasma versus soro.
4. Relativamente às réplicas das amostras de soro, houve um óptimo desempenho, com uma correlação na ordem dos 100%, mesmo com amostras diluídas a  $\frac{1}{2}$ , o que demonstra a **reprodutibilidade** do teste.
5. Nas amostras positivas para HCV e/ou HIV, verificou-se a não interferência nos resultados obtidos quer para soro, quer para plasma, uma vez que as amostras negativas que tinham HCV ou HIV positivos revelaram-se sempre “verdadeiros negativos”, demonstrando assim a **especificidade** do teste.
6. Quanto à **estabilidade** da amostra e apesar de terem sido estudados apenas 3 indivíduos, com amostras de soro e plasma (que foram sujeitas a dois ciclos de

Congelamento-Descongelamento), demonstrou-se ter havido pouca alteração nas cargas virais, cujas diferenças foram sempre mínimas e inferiores a 1log, como seria exigível.

7. O Kit demonstrou resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos testado com o plasma *versus* soro, o que determina a sua **robustez**.
8. A proximidade dos resultados do plasma *versus* soro em relação ao valor verdadeiro, para demonstrar a exactidão do kit, não foi comprovada por ainda não existir no mercado controlo de qualidade para as cargas do VHB.
9. Os factores **idade e sexo** dos indivíduos não interferiram nos resultados. Quando se compararam os resultados de plasma e soro, não houve estatisticamente qualquer correlação entre estas variáveis e os resultados obtidos.

De um modo geral, a diferença da virémia do DNA do VHB obtida para as amostras de plasma e para as amostras de soro, por PCR-RT do teste Cobas® AmpliPrep / Cobas® TaqMan® HBV tiveram um coeficiente de variação mínimo, e sempre inferior a 1 log (UI/ml), pelo que se verificou uma diferença estatisticamente significativa entre estas duas variáveis. Estatisticamente, com um  $p < 0,05$ , demonstra a possibilidade de usar arbitrariamente amostras de soro e de plasma para a monitorização de cargas virais.

Os resultados obtidos, ao mostrarem uma elevada correlação entre as amostras de plasma e soro, permitem afirmar que com este estudo se validou o uso de soro para o teste Cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan HBV, o que à data do início deste trabalho não se encontrava efectuado, pelo que foi o objectivo principal deste trabalho. Ressalve-se que a necessidade desta validação era por demais importante, e a própria Roche, numa outra versão recentemente lançada (Abril de 2009) apresentou o teste já validado para os dois tipos de amostra, como já foi referido na introdução desta dissertação. Este teste vem ao encontro das necessidades dos laboratórios, que também tinham dificuldades em fazer o teste só com amostras de plasma.

O teste executado só com amostras de plasma era um obstáculo significativo na rotina dos laboratórios, que usam geralmente amostras de soro para outros testes. Obrigaria a outra colheita, o que acarretaria mais incómodo para os doentes e mais onerosidade.



## **CAPÍTULO VI**

## 6 - Conclusão

Após análise e discussão dos resultados da carga viral do vírus da Hepatite B, em plasma versus soro, por PCR-RT, pelo teste Cobas® AmpliPrep / Cobas® TaqMan® HBV conclui-se que se poderão validar os resultados em amostras de soro (Tab. 25), aspecto que como referido na justificação do estudo se reveste da maior importância para os laboratórios.

**Tabela 25: Características e comparação de alguns testes de PCR para o DNA do VHB , agora com a nossa validação para o soro no teste Cobas TaqMan 48 HBV por PCR-RT.**

	Versant® HBV DNA 3.0 (Siemens)	COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV Test (Roche)	COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV Test v2.0 (Roche)
Metodologia	bDNA	RT-PCR	RT-PCR
PCR Qualitativa	-	✓	✓
PCR quantitativa	✓	✓	✓
Amostra de plasma	✓	✓	✓
Amostra de Soro	✓	✓	✓
Volume de amostra (µl)	50	1000	650
Sensibilidade (UI/ml)	357	12	20
Tempo execução (96t)	21h	9h	9h
Nº testes/Kit	96	48	72
Lançamento no mercado	2002	Setembro. 2007	Abril. 2009

## **CAPÍTULO VII**

## 7 – Referências Bibliográficas

Akuta N., Kumada H. Influence of Hepatitis B Virus genotypes on the response to antiviral therapies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004; 55: 139-142.

Alter, M.J. Epidemiology of Hepatitis B in Europe and worldwide. *Journal of Hepatology* 2003; 39: 64-69.

Araújo P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B* 2009; 877: 2224-34.

Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO: Genotype H: A new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002;83:2059–2073.

Areias J. Hepatite Crónica pelo vírus da hepatite B: diagnóstico e história natural 1997; 2: 1-2.

Atkinson W. *Epidemiology and Prevention of Vaccine Preventable Diseases* (3ª Edição). Atlanta: CDC - Centers for Disease Control and Prevention 1996.

Blok T., Guo H., Guo J-T. Molecular Virology of hepatitis B vírus for clinicians. *Clinical Liver Dideases* 2007; 11: 685-706.

Blumberg B., Alter H., Visaich S. A“new”antigen leukemia sera. *Journal of the American Medical Association* 1965; 348: 541-546.

Blumberg, M.E., Gerstley, B.S. et al. A serum antigen (Antigen Australia) in Down´s syndrome and hepatitis. *Ann. Int. Med.* 1967; 66: 924-931.

Bowden, D. Thompson, A. New developments in HBV molecular diagnostics and quantitative serology. *Hepatol Int* 2008; 2: S3-S11.

Buster J., Janssen H. Antiviral treatment for chronic hepatitis B virus infection – immune modulation or viral suppression? *The Netherlands Journal of Medicine* 2006; 64: 6.

Bustin S., Benes V., Garson J. et al. The MIQE Guidelines: minimum Information for publication of quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 2009; 55: 4: 611-622.

Castro R. S. (1999). Epidemiologia da Hepatite Vírica, *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, Lisboa 1999; 2:89-99.

Chen B. Clinical Significance of the Hepatitis B Virus Genotype. *Fu Jen Journal of Medicine* 2004; 2: 273-282.

Chevaliez S., Laperche S. Performance of the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan Real-Time PCR Assay for Hepatitis B Virus DNA Quantification. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46: 1716-1723.

Chopra C., Gupta P., et al. Real Time PCR HBV-DNA Analysis: Significance and first experience in armed forces. *MJAFI* 2005; 61: 234-237.

Colacino M., Heinz B.A. Hepatitis Prevention and Treatment – Series: Milestones in Drug Therapy, Birkhauser Verlag AG, Basel 2004: 9.

Dane D S, Cameron C H & Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1970;1:695-8.

Engleberg et al. *Mechanisms of Microbial Disease* (4ª Edição) 2007; 43.  
European Association for the Study of the Liver (EASL)Jury. *J Hepatol.* 2003; 39(suppl): S3-S25.

European Association for the Study of the Liver (EASL). EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B. *Journal of Hepatology* 2009; 50(2): 227-242.

Fang, C., Blood Screening for HBV DNA. *Journal of Clinical Virology* 2006; 36: Suppl. 1, S30-32.

Ferreira M., Borges A. Avanços no tratamento da hepatite pelo vírus B. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2007; 40(4): 451-462.

FDA. Guidance for Industry – Submission of Laboratory Packages By Accredited Laboratories. January 2009 (<http://www.fda.gov/regulatoryInformation/Guidances/ucm125343.htm>).

Fonseca J. História natural da hepatite crônica B. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2007; 40: 672-677.

Garbuglia A.R., Angeletti C., et al. Comparison of Versant HBV DNA 3.0 and Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan Assays for Hepatitis B DNA Quantitation: Possible Clinical Implications. *Journal of Virological Methods* 2007; 146: 274-280.

Gerlich, W., Breakthrough of hepatitis B virus escape mutants after vaccination and virus reactivation. *Journal of Clinical Virology* 2006; 36: Suppl. 1, S18-22.

Hatakeyama T., Noguchi C., Hiraga, N., et al. Serum HBV RNA is a predictor of early emergency of the YMDD mutant in patients treated with lamivudina. *Hepatology* 2007; 45: 1179-86.

Hideaki, K., Gish R., et al. Eight genotypes of HBV infecting patients from San Francisco and their demographic, clinical and virological characteristics. *Journal of Clinical Virology* 2004; 73:516-521.

Hatzakis A, Magiorkinis, E Haida C. HBV virological assessment. *Journal of Hepatology* 2006; 44: 71-76.

Hochberger, S., Althof D., et al. Fully automated quantitation of Hepatitis B virus (HBV) DNA in human plasma by the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan Sistem. *Journal of Clinical Virology* 2006; 35: 373-380.

Hou J., Liu Z., Gu F. Epidemiology and prevention of hepatitis B virus Infection. *International Journal of Medical Sciences* 2005; 2: 50-57.

Kidd-Ljunggren, K., Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *Journal of General Virology* 2002; 83: 1267-1280.

Kidd-Ljunggren, K., Myhre E., Blackberg, J. Clinical and Serological Variation between Patients Infected with Different Hepatitis B Virus Genotypes. *Journal of Clinical Microbiology*.2004; 42: 5837-5841.

Kleinman, H., Busch, M., Assessing the impact of HBV NAT on window period reduction and residual risk, *Journal of Clinical Virology* 2006; 36: Suppl. 1, S23-29.

Lee WM. Hepatitis B virus infection. *The New England Journal of Medicine* 1997; 337: 1773-1745.

Lelie N., Heaton A. HepatitisB- A review of the role of NAT in enhancing blood safety *Journal of Clinical Virology* 2006; 36, Suppl. 1: S1-2.

Levinson W. Review of medical microbiology and immunology (9ª Edição) 2006; 41: 294.

Locarnini S. Hepatitis B viral resistance: mechanisms and diagnosis. *Journal of Hepatology* 2003;39: S124-S132.

Locarnini S. Molecular virology of hepatitis B virus. *Seminars in Liver Disease* 2004; 24 (1): 3-10.

Lok A., Heathcote J., Hoofnagle J. Management of hepatitis B: 2000- Summary of a Workshop. *Gastroenterology* 2001; 120: 1828-1853.

Martinhago C., Oliveira R., Canas M. C., Vagnini L. et al. Determinação precoce do sexo fetal pela análise do DNA no plasma materno. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 2006; 28:3.

Mendes T., Pitella A.M. Recentes Avanços Em Hepatites.São Paulo, Fundo Editorial BYK 1994.

Murray P., Rosenthal K., et al. Medical Microbiology (5ª Edição), 2005; 66: 585-592.

Norder, H., Hammas, B., Lofdahl, S., et al. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. Journal of General Virolog 1992b;73: 1201-1208.

Niesters, H., Honkoop, P., Haagsma, E., et al. Identification of more than one mutation in the hepatitis B virus polimerase gene arising during prolonged Lamiduvine treatment. The Journal of Infectious Diseases 1988; 177: 1382-5.

Okamoto, H., Tsuda, F., Sakugawa, H., Sastrosowignjo, R. I., Imai, M., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. Journal of General Virology 1988; 69: 2575-2583.

OMS - Organização Mundial da Saúde. Hepatitis B: Fact sheets. [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/index.html).

Osiony C., Giles E. Evaluation of the HBV Genotyping Assay for Determination of Hepatitis B Virus Genotype. Journal of Clinical Microbiology 2003; 41:5473-5477.

Pawlotsky JM. Molecular Diagnosis of Viral Hepatitis. Gastroenterology 2002; 122: 1554-68.

Pawlotsky JM., Dusheiko G., Hatzakis A., et al. Virological Monitoring of Hepatitis B Virus Therapy in Clinical Trials and Practice: recommendations for a standardized approach. Gastroenterology 2008;134:405-415.

Reid D., Grist N. R. Imunização contra a hepatite B, Nursing – Revista Técnica de Enfermagem, Lisboa 1989; 20: 44-48.

Roche Molecular. Systems.The Evolution of PCR. Hacienda Drive, EUA 2003

Rosin C., Pillet A., et al. Evaluation of the Cobas AmpliPrep-Total Nucleic Acid Isolation- Cobas TaqMan Hepatitis B Virus (HBV) Quantitative Test and Comparison to the Versant HBV DNA 3.0 Assay. Journal of Clinical Virology. 2006; 44: 1390-1399.

Sablon E., Shapiro F. Avances in Molecular Diagnosis of HBV infection and Drug Resistence. International Journal of Medical Sciences. 2005; 2: 8-16.

Schaechter M., Engleberg C., Terence S., Dermody T., DiRita V. Schaechter's Mechanisms of Microbial Disease (4ª edição) 2007: 431.

Seeger, C., Mason, W. Hepatitis B Virus Biology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000; 64:51-68.

Sherlock S, Dooley J. Diseases of liver and biliary system. Blackwell Science (11ª Edição) 2002; 17:286-288.

Shetty K., Wu G. Chronic Viral Hepatitis diagnosis and therapeutics. Humana press (2ª Edição) 2009: 380-385.

Shors T. Understanding Viruses. Jonas and Bartlett Publishers (1ª edição) 2008; 17:474-5.

Simão, A., Santos, A. Icterícia - Diagnóstico Laboratorial, Novembro 1994.

Simão, A., Chaves, F. C., Carvalho, A., Santos, A., et al. Biblioteca Hepatológica: hepatites virais crônicas. Permanyer Portugal 2007.

Specter, S. Viral hepatitis: diagnosis, therapy, and prevention. Totowa, NJ, EUA. Humana Press Inc. 1999: 1.

SWGDM. Revised Guidelines Validation. Forensic Science Communications 2004; 6: 3.

Thomas H., Lemon S., Zuckerman A., et al. Viral Hepatitis. Wiley-Blackwell. (3ª Edição) 2005; S IV: 149-370.

Toyoda H., Kumada T., et al. Prevalence of Low-Level Hepatitis B Viremia in Patients with HBV Surface Antigen-Negative Hepatocellular Carcinoma with and without Hepatitis C Virus Infection in Japan: Analysis by Cobas TaqMan Real-Time PCR. Intervirology 2007; 50: 241-244.

Vernet, G. Molecular diagnostics in virology. Journal of Clinical Virology 2004; 31:239-247.

Watzinger, F. , Ebner K., Lion T. Detection and monitoring by real-time PCR. Molecular Aspects of Medicine – Elsevier 2006; 27: 254-298.

White D. O., Fenner F. Medical Virology (4ª Edição) 1994; 22: 359-369.

Wolters G. et al. Solid-phase enzyme-immunoassay for detection of hepatitis B surface antigen. Journal of clinical pathology 1976; 29: 873-879.




Zhao J-R., Bai Y-J., et al. Detection of hepatitis B virus DNA by real-time PCR using TaqMan-MGB probe technology. *World Journal of Gastroenterology* 2005; 11: 508-510.

Zoulin, F. Antiviral Therapy of chronic hepatitis B. *Antiviral Research*. Elsevier 2006; 71: 206-215.

Zuckerman A.J., Banatvala J., Schoub B., et al. *Principles and Practice of Clinical Virology*. Wiley Blackwell (6ª edição) 2009: 273-307.

## **ANEXOS**

# ANEXO 1: Bula do teste Cobas® Ampliprep/Cobas® TaqMan® HBV



## COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan HBV Test

PARA UTILIZAÇÃO *IN VITRO*.

COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan HBV Test	<b>HBMCP</b>	48 Tests	P/N: 03587819 190
COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan Wash Reagent	<b>PG WR</b>	5.1 Liters	P/N: 0358797 190

**UTILIZAÇÃO**

O Teste COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan HBV é um teste de amplificação de ácidos nucleicos *in vitro* destinado à quantificação do ADN do Vírus da Hepatite B (HBV), no plasma humano, através do Instrumento COBAS Ampliprep para processamento automatizado das amostras e do Analisador COBAS TaqMan ou Analisador COBAS TaqMan 48 para amplificação e detecção automatizadas.

Este teste destina-se a ser utilizado em conjunto com a apresentação clínica e com outros marcadores laboratoriais como ajuda para a avaliação da resposta viral ao tratamento anti-viral, conforme medida por alterações nos níveis de ADN do HBV.

O Teste COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan HBV não se destina a ser utilizado como um teste de rastreio para a presença do HBV no sangue ou em produtos derivados do sangue nem como um teste de diagnóstico visando confirmar a presença de infecção pelo HBV.

## RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

O Vírus da Hepatite B (HBV) é um de vários vírus que se sabe provocarem hepatite viral. Mais de dois bilhões de pessoas em todo o mundo foram infectadas pelo HBV, e mais de 350 milhões são portadores cronicamente infectados<sup>1</sup>. Os portadores crônicos apresentam um risco elevado de complicações a longo prazo de infecção, incluindo hepatite crônica, cirrose e carcinoma hepatocelular<sup>2,3,4</sup>. Utilizam-se habitualmente marcadores sorológicos como indicadores de diagnóstico e/ou prognóstico de infecção aguda ou crônica por HBV. O marcador mais frequente de infecção por HBV consiste na presença do antígeno de superfície do HBV (HBsAg). Embora nos portadores possa desaparecer HBsAg e se possa desenvolver anticorpo contra o HBsAg, parece existir ainda um risco de complicações hepáticas graves mais tarde na vida<sup>5,6</sup>. O antígeno do HBV (HBsAg) é habitualmente utilizado como marcador secundário para indicar replicação activa do HBV associada a doença hepática progressiva. A incapacidade para fazer com que o HBsAg desapareça parece aumentar o risco de doença hepática em estágio final<sup>7,8</sup>. Estirpes variantes de HBV podem produzir HBsAg que não é detectável no soro ou a estirpe pode perder a capacidade para produzir HBsAg, mesmo quando está presente uma infecção activa<sup>9</sup>. Por conseguinte, a utilização deste marcador para monitorizar a progressão da doença pode ter uma utilidade limitada<sup>10</sup>. Foi referido que a capacidade para detectar ADN do HBV no soro possui valor prognóstico para a evolução de infecções agudas e crônicas por HBV<sup>11-14</sup>. A metodologia pode permitir a detecção de ADN do HBV após o desaparecimento de HBsAg<sup>15</sup> ou a detecção de HBV sem marcadores sorológicos<sup>16</sup>. Contudo, não foi ainda estabelecida uma relação entre os marcadores sorológicos e os níveis de ADN do HBV. A eficácia da terapêutica antiviral utilizada no tratamento de doentes com HBV também pode ser avaliada por marcadores sorológicos ou por medição da função das enzimas hepáticas. Todavia, pensa-se que a medida mais directa e fiável de replicação viral consiste na quantificação do ADN viral do HBV em soro ou plasma<sup>13,17-19</sup>. Uma desvantagem rápida e manida dos níveis de ADN do HBV em doentes submetidos a tratamento com a interferão, Lamivudina, Ganciclovir ou Adefovir Dipivoxil mostrou constituir um factor de previsão para um resultado favorável do tratamento<sup>10,20-24</sup>. A monitorização dos níveis de ADN do HBV pode prever o desenvolvimento de resistência a Lamivudina<sup>25</sup>. Por conseguinte, um teste quantitativo para a determinação do ADN do HBV constitui uma importante ferramenta que pode ser utilizada em conjunto com outros marcadores sorológicos no tratamento da infecção por HBV.

No plasma, o ADN do HBV pode ser quantificado através de tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos, como é o caso da Reacção de Polimerização em Cadeia (PCR - "Polymerase Chain Reaction")<sup>27-28</sup>. O Teste COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan HBV usa a tecnologia de PCR para atingir uma sensibilidade e limites dinâmicos máximos na detecção quantitativa do ADN do HBV em plasma anti-coagulado com EDTA.

1

## Amplificação por PCR

A reacção de amplificação por PCR é efectuada com a enzima termoestável recombinante *Thermus specie* ADN Polimerase (Z05). Na presença de manganês (Mn<sup>2+</sup>) e sob condições de tamponamento adequadas, a Z05 apresenta uma actividade de polimerase do ADN<sup>1,32</sup>. Tal permite que a amplificação por PCR ocorra em conjunto com a detecção em tempo real do amplicon.

As amostras processadas são adicionadas à mistura de amplificação em tubos de amplificação (tubo-K) nos quais ocorre a amplificação por PCR. Na presença de Mn<sup>2+</sup> e de trifosfatos de deoxinucleósidos em excesso (dNTPs), incluindo trifosfatos de deoxiadenosina, deoxiguanosina, deoxicitidina e deoxiuridina, a polimerase Z05 alonga os iniciadores ligados, dando origem a uma cadeia de ADN.

## Amplificação do Alvo

As amostras processadas são adicionadas à mistura de amplificação em tubos de amplificação (tubo-K) nos quais ocorre a amplificação por PCR. O termociclador do Analisador COBAS TaqMan ou do Analisador COBAS TaqMan 48 aquece a mistura de reacção para desnaturar as duplas cadeias de ADN produzidas e expor as sequências alvo do iniciador específico sobre o genoma do ADN circular do HBV e do ADN do PQ do HBV. À medida que a mistura aquece, os iniciadores formam um anel com o ADN alvo. A Polimerase do ADN Z05 *Thermus specie* termoestável (Z05), na presença de Mn<sup>2+</sup> e trifosfatos de deoxinucleósidos em excesso (dNTPs), incluindo trifosfatos de deoxiadenosina, deoxiguanosina, deoxicitidina e deoxiuridina (em vez de timidina), prolonga os iniciadores ligados ao longo do modelo alvo para produzir uma molécula de ADN de dupla cadeia denominada amplicon. O Analisador COBAS TaqMan ou o Analisador COBAS TaqMan 48 repete automaticamente este processo durante um determinado número de ciclos, cada um duplicando eficazmente a quantidade de ADN amplicon. O número requerido de ciclos é pré-programado no Analisador COBAS TaqMan ou no Analisador COBAS TaqMan 48. A amplificação tem apenas lugar na região do genoma do HBV que se encontra entre os iniciadores; não se amplifica todo o genoma do HBV.

## Amplificação Selectiva

No Teste COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan HBV, a amplificação selectiva do ácido nucleico alvo da amostra clínica é conseguida com a utilização de uma enzima AmpErase (uracil-N-glicosilase) e de trifosfato de deoxiuridina (dUTP). A enzima AmpErase reconhece e catalisa a destruição de cadeias de ADN contendo deoxiuridina<sup>29</sup>, mas não de ADN contendo deoxitimidina. A deoxiuridina não se encontra existente no ADN presente na natureza, mas está sempre presente no amplicon, devido ao uso de trifosfato de deoxiuridina como dos dNTPs do reagente de Mistura Principal por conseguinte, o amplicon é o único que contém deoxiuridina. A deoxiuridina torna o amplicon contaminante susceptível à destruição pela enzima AmpErase antes da amplificação do ADN alvo. Para além disso, qualquer produto inespecífico formado depois da activação inicial da Mistura Principal pelo manganês é destruído pela enzima AmpErase. A enzima AmpErase, que está incluída no reagente de Mistura Principal, catalisa a clivagem de ADN contendo deoxiuridina em resíduos de deoxiuridina, ao abrir a cadeia de deoxiribose na posição C1. Quando aquecida, no primeiro passo de amplificação térmica, a cadeia de ADN do amplicon quebra-se na posição da deoxiuridina, tornando assim o ADN não amplificável. A enzima AmpErase permanece inactiva durante um longo período de tempo uma vez exposto a temperaturas acima dos 55°C, ou seja, durante os passos de ciclo de PCR, pelo que não destrói o amplicon alvo formado depois da reacção de PCR.

## Detecção dos Produtos de PCR num Teste COBAS TaqMan

O Teste COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan HBV utiliza tecnologia de PCR em tempo real<sup>27,28</sup>. A utilização de sondas fluorescentes duplamente marcadas permite a detecção em tempo real da acumulação de produtos da PCR pela monitorização da emissão das corantes sinalizadores fluorescentes libertados durante o processo de amplificação. As sondas consistem em sondas oligonucleotídicas específicas para o corante e para o PQ do HBV com um corante sinalizador e um corante supressor. No Teste COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan HBV, as sondas do HBV e do PQ do HBV estão marcadas com diferentes corantes sinalizadores fluorescentes. Quando estas sondas estão intactas, a fluorescência do corante sinalizador é suprimida pela proximidade do corante supressor devido aos efeitos de transferência de energia do tipo Förster. Durante a PCR, a sonda hibridiza-se a uma sequência alvo e é clivada pela actividade da nucleáse 5' → 3' da polimerase do ADN Z05 termoestável. Quando os corantes de sinalização e de supressão são libertados e separados, a supressão deixa de ocorrer e é aumentada a actividade fluorescente do corante sinalizador. A amplificação do ADN do HBV e do ADN de PQ do HBV é determinada independentemente em diferentes comprimentos de onda. Este processo é repetido durante um número designado de ciclos, sendo a intensidade da emissão dos corantes sinalizadores individualmente aumentada eficazmente com cada ciclo, permitindo a identificação independente do ADN do HBV e do ADN de PQ do HBV. O ciclo de PCR onde uma curva de crescimento inicia um crescimento exponencial está relacionada com a quantidade de material iniciador no princípio da PCR.

## PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O Teste COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan HBV é um teste de amplificação de ácidos nucleicos destinado à quantificação do ADN do Vírus da Hepatite B (HBV) em plasma humano. A preparação das amostras é automatizada através da utilização do Instrumento COBAS Ampliprep com amplificação e a detecção automatizadas através da utilização do Analisador COBAS TaqMan ou Analisador COBAS TaqMan 48.

O Teste COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan HBV baseia-se em dois processos principais: (1) preparação da amostra para isolar ADN do HBV e (2) amplificação simultânea por PCR<sup>27</sup> do ADN alvo e detecção de sonda de detecção oligonucleotídica duplamente marcada e clivada específica para o alvo.

O Teste COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan HBV permite a preparação automatizada das amostras, seguida da amplificação e detecção automatizadas por PCR do ADN alvo para o HBV e do ADN do Padrão de Quantificação (PQ) do HBV. O reagente de Mistura Principal contém pares de iniciadores e sondas específicas para o ADN do HBV e para o ADN do PQ do HBV. A Mistura Principal foi desenvolvida para assegurar a quantificação equivalente dos genótipos A a D do HBV. A detecção de ADN amplificado é efectuada através de uma sonda oligonucleotídica duplamente marcada específica para o alvo e específica para o PQ, que permite a identificação independente do amplicon do HBV e do amplicon do PQ do HBV.

A quantificação do ADN viral do HBV é realizada utilizando o PQ do HBV. Compensa os efeitos de inibição e controla os processos de preparação e amplificação, visando permitir uma quantificação mais rigorosa do ADN do HBV presente em cada amostra. Trata-se de uma estrutura de ADN não infeccioso que contém sequências de HBV com locais de ligação ao iniciador idênticos aos do ADN alvo do HBV e uma região única de ligação da sonda que permite que o amplicon do PQ do HBV se distinga do amplicon do HBV.

O PQ do HBV é incorporado em cada amostra a um número conhecido de cópias e é submetido aos passos de preparação da amostra subsequentes, amplificação por PCR simultânea e detecção das sondas de detecção oligonucleotídicas duplamente marcadas e clivadas. O Analisador COBAS TaqMan ou COBAS TaqMan 48 calcula os níveis de ADN do HBV presentes nas amostras de teste comparando o sinal do HBV com o sinal do PQ do HBV em cada amostra e controlo.

## Seleção do Alvo

A seleção da sequência de ADN alvo do HBV depende da identificação de regiões dentro do genoma do HBV que apresentem uma conservação máxima da sequência entre os vários genótipos do HBV. É usada a preparação de amostra genérica à base de sílica para capturar o ADN do HBV e o ADN do PQ do HBV e utilizam-se oligonucleótidos definidos como iniciadores na amplificação do ADN do HBV e do ADN do PQ do HBV. Uma sonda oligonucleotídica duplamente marcada específica para o alvo e específica para o PQ permite a identificação independente do amplicon do HBV e do amplicon do PQ do HBV. Por conseguinte, a seleção adequada dos iniciadores e da sonda de detecção oligonucleotídica duplamente marcada é essencial para que o teste tenha capacidade para amplificar e detectar os genótipos do HBV. O Teste COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan HBV utiliza três iniciadores de amplificação para PCR. Uma sonda duplamente marcada geradora de sinal hibridiza-se com a cadeia anti-sense e é clivada pela polimerase do ADN Z05 durante o prolongamento dos iniciadores. O amplicon dos genótipos A-F é constituído por uma sequência de 145 nucleótidos. O genótipo do amplicon G, contudo, é constituído por uma sequência de 181 nucleótidos. Uma inserção de 36 bases dentro da região pré-Core/Core altamente conservada e de cadeia única do genoma do HBV resulta num amplicon maior para o genótipo G<sup>30</sup>.

## Preparação das Amostras

O Teste COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan HBV utiliza a preparação de amostras automatizada com o Instrumento COBAS Ampliprep através de uma técnica genérica de captura à base de sílica. O procedimento processa 850 µl de plasma. As partículas virais de HBV são lisadas por incubação a temperatura elevada com uma protease e tampão catiónico de lise/ligação, que liberta ácidos nucleicos e protege o ADN do HBV libertado das ADNs no plasma. Introduz-se a protease num número conhecido de moléculas de PQ do ADN do HBV em cada amostra, em conjunto com o reagente de lise e as partículas magnéticas de vidro. Subsequentemente, a mistura é incubada e o ADN do HBV e o ADN do PQ do HBV ligam-se à superfície das partículas de vidro. As substâncias não ligadas, como sais, proteínas e outras impurezas celulares, são removidas lavando as partículas magnéticas de vidro. Depois da separação das esferas e conclusão dos passos de lavagem, os ácidos nucleicos adsorvidos são eluídos a uma temperatura elevada com uma solução aquosa. A amostra processada, contendo as partículas magnéticas de vidro bem como o ADN do HBV e o ADN do PQ do HBV libertados, é adicionada à mistura de amplificação e transferida para o Analisador COBAS TaqMan ou Analisador COBAS TaqMan 48. O ADN do HBV alvo e o ADN do PQ do HBV são amplificados e detectados simultaneamente por clivagem de uma sonda oligonucleotídica duplamente marcada específica para o alvo e específica para o PQ.

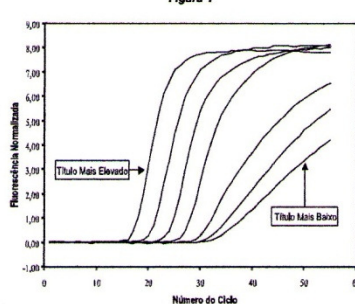
2

## Bases Essenciais de Quantificação do Teste COBAS TaqMan

O Teste COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan HBV oferece resultados quantitativos precisos sobre um limite amplo e dinâmico, dado que a monitorização do amplicon é efectuada durante a fase exponencial de amplificação. Quando mais elevado for o título do HBV de uma amostra, mais cedo surge a fluorescência do corante sinalizador da sonda do HBV acima do nível de fluorescência da linha de base (ver a Figura 1). Dado que a quantidade de ADN do PQ (PQ) do HBV é constante entre todas as amostras, a fluorescência do corante sinalizador da sonda do PQ do HBV deve aparecer no mesmo ciclo para todas as amostras (ver Figura 2). As amostras onde a fluorescência do PQ é afectada, a concentração é ajustada em conformidade. O aparecimento do sinal fluorescente específico é referido como um valor de limite crítico (Ct). O Ct é definido como o número de ciclos de amplificação em que a fluorescência do corante sinalizador excede um limite predeterminado (Nível Atribuído de Fluorescência) e inicia o princípio de uma fase de crescimento exponencial deste sinal (ver a Figura 3). Um valor mais elevado de Ct indica um título mais baixo do material alvo do HBV inicial. Um aumento de 2 vezes do título está correlacionado com uma redução de 1 Ct para o HBV alvo, enquanto que um aumento de 10 vezes do título correlaciona-se com uma redução de 3,3 Ct.

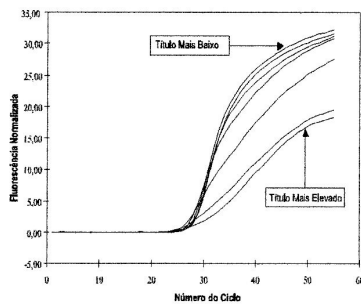
A Figura 1 representa as curvas de crescimento alvo para uma série de diluições do vírus abrangendo um limite de 5-log<sub>10</sub>. À medida que a concentração do vírus aumenta, as curvas de crescimento desviam-se para ciclos precoces. Consequentemente, a curva de crescimento mais à esquerda corresponde ao nível de título viral mais elevado, enquanto que a curva de crescimento mais à direita corresponde ao nível de título viral mais baixo.

Figura 1



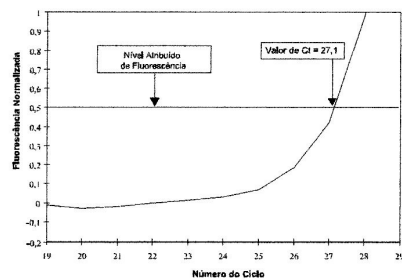
A Figura 2 representa as curvas de crescimento do Padrão de Quantificação para amostras a partir de uma série de diluições virais que abrangem um limite de 5-log<sub>10</sub>. A quantidade do Padrão de Quantificação acrescentada a cada amostra é constante para cada reacção. O valor Ct do Padrão de Quantificação é semelhante, independentemente do título viral.

Figura 2



A Figura 3 apresenta um exemplo de como os valores de fluorescência em cada ciclo são normalizados para cada curva de crescimento. O número fracionário de ciclo (Ct) é calculado no ponto onde o sinal fluorescente atravessa o Nível Atribuído de Fluorescência.

Figura 3



5

6

## Quantificação do ADN do HBV

O Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV quantifica o ADN viral do HBV utilizando uma segunda sequência alvo (Padrão de Quantificação do HBV) que é adicionada à amostra de teste numa concentração conhecida. O PQ do HBV é uma estrutura de ADN não infecciosa que contém fragmentos de sequências de HBV com regiões de ligação para o iniciador idênticas às da sequência alvo do HBV. O PQ do HBV contém regiões de ligação dos iniciadores do HBV e origina um produto de amplificação com o mesmo comprimento e composição básica do ADN do HBV alvo. A região de ligação da sonda de detecção do PQ do HBV foi modificada para permitir a distinção entre o amplicon do PQ do HBV e o amplicon do HBV alvo.

Durante a fase de ligação da PCR no Analisador COBAS TaqMan ou no Analisador COBAS TaqMan 48, as amostras são iluminadas e excitadas através de luz filtrada e são recolhidos dados de fluorescência de emissões filtradas para cada amostra. As leituras de cada amostra são então corrigidas tendo em conta as flutuações de instrumentos. Estas leituras de fluorescência são enviadas pelo instrumento para o software AMPLILINK e armazenadas numa base de dados. Verificações prévias são utilizadas para determinar se os dados de ADN do HBV e de ADN do PQ do HBV representam conjuntos válidos, sendo produzidos indicadores quando os dados se encontram fora dos limites predefinidos. Depois de concluídas e aprovadas todas as verificações prévias, as leituras de fluorescência são processadas para gerar valores de Ct para o ADN do HBV e para o ADN do PQ do HBV. As constantes de calibragem específicas dos lotes fornecidas com o Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV são utilizadas para calcular o valor do título para as amostras e controlos com base nos valores Ct de ADN do HBV e de ADN do PQ do HBV. O Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV está normalizado de acordo com o Padrão Internacional da OMS para o ADN do vírus da Hepatite B para Testes com Ensaios de Tecnologia de Ácidos Nucleicos (NAT) (NIBSC 97/746)<sup>29</sup> e os resultados do título são reportados em Unidades Internacionais (UI/ml).

## REAGENTES

**COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test**  
(P/N: 03587819 190)

**HBMCAP**

48 Testes

### HBV CS1

(Cassete de Reagente de Partículas Magnéticas de Vidro HBV)

1 x 48 Testes

Partículas magnéticas de vidro  
93% de Isopropanol

Xi



83% (p/p) de Isopropanol

Irritante

F



93% (p/p) de Isopropanol

Altamente Inflamável

### HBV CS2

(Cassete de Reagente de Lise do HBV)

1 x 48 Testes

Citrato de sódio dihidratado  
42,5% de Tiocianato de guanidina  
< 14% de Polidocanól  
0,9% de Dilitreitol

Xn



42,5% (p/p) de Tiocianato de guanidina

Nocivo

### HBV CS3

Cassete Multi-Reagente de HBV contendo:

1 x 48 Testes

#### Pase

(Solução de Proteinase)

Tampão Tris  
< 0,05% de EDTA  
Cloreto de cálcio  
Acetato de cálcio  
≤ 7,8% de Proteinase  
Glicerol

Xn



≤ 7,8% (p/p) de Proteinase

Nocivo

#### EB

(Tampão de Eluição)

Tampão base Tris  
0,2% de Metilparabeno

1 x 7,0 ml

### HBV CS4

Cassete de Reagente Específica de Teste HBV contendo:

1 x 48 Testes

#### HBV QS

(Padrão de Quantificação do HBV)

1 x 3,6 ml

Tampão Tris-HCl  
EDTA  
< 0,005% poli A ARN (sintético)  
< 0,001% de Plasmídeo de ADN não infeccioso, linearizado, de dupla cadeia  
contendo um insersor com sequências de ligação do iniciador do HBV  
e uma região única de ligação à sonda  
0,05% de Azida sódica

#### HBV MMX

(Mistura Principal HBV)

1 x 2,5 ml

Tampão Tricina  
Acetato de potássio  
Hidróxido de potássio  
0,09% de Azida sódica  
Glicerol  
< 0,04% de dATP, dCTP, dGTP, dUTP  
< 0,003% de iniciadores do HBV a jusante e a montante  
< 0,003% de Aptâmero oligonucleotídico  
< 0,003% de Sondas oligonucleotídicas marcadas com fluorescência  
específicas para o HBV e Padrão de Quantificação do HBV  
< 0,05% de Polimerase do ADN 205 (de origem microbiana)  
< 0,1% de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilase) (de origem microbiana)

#### HBV Mn<sup>2+</sup>

(Controlo Positivo Alto do HBV)

1 x 19,8 ml

< 0,5% de Acetato de manganês  
Ácido acético glacial  
0,09% de Azida sódica

#### HBV H(+)

(Controlo Positivo Alto do HBV)

4 x 1,0 ml

< 0,001% de Plasmídeo de ADN linearizado, de dupla cadeia contendo  
sequências de HBV  
Plasma Humano Negativo, não reactivo em testes para anticorpos contra  
HCV, anticorpos contra HIV-1/2, antígeno p24 do HIV e HBsAg;  
ARN do HIV-1, ARN do HCV e ADN do HBV não detectáveis por métodos de PCR  
0,1% de ProClin 300

### HBV L(+)

(Controlo Positivo Baixo do HBV)

4 x 1,0 ml

< 0,001% de Plasmídeo de ADN linearizado, de dupla cadeia contendo  
sequências de HBV  
Plasma Humano Negativo, não reactivo em testes para anticorpos contra  
HCV, anticorpos contra HIV-1/2, antígeno p24 do HIV e HBsAg;  
ARN do HIV-1, ARN do HCV e ADN do HBV não detectáveis por métodos de PCR  
0,1% de ProClin 300

### CTM (-) C

(Controlo Negativo (Plasma Humano) COBAS TaqMan)

4 x 1,0 ml

Plasma Humano Negativo, não reactivo em testes para anticorpos contra  
HCV, anticorpos contra HIV-1/2, antígeno p24 do HIV e HBsAg;  
ARN do HIV-1, ARN do HCV e ADN do HBV não detectáveis por métodos de PCR  
0,1% de ProClin 300

### HBV H(+)

(Clipe de Códigos de Barras de Controlo Positivo Alto do HBV)

1 x 4 Clipes

### HBV L(+)

(Clipe de Códigos de Barras de Controlo Positivo Baixo do HBV)

1 x 4 Clipes

### HBV (-) C

(Clipe de Códigos de Barras de Controlo Negativo do HBV)

1 x 4 Clipes

## COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan Wash Reagent

Reagente de Lavagem COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan  
(P/N: 03587797 190)

**PG WR**

### PQ WR

(Reagente de Lavagem COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan)

1 x 5,1 l

Citrato de sódio dihidratado  
< 0,1% de N-Metilisotiazolona-HCl

## ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

### A. PARA UTILIZAÇÃO IN VITRO.

- Este teste destina-se a ser utilizado com plasma colhido em anticoagulante EDTA. Este teste não se destina a ser utilizado com soro humano.
- Não pipete com a boca.
- Não coma, não beba nem fume em áreas de trabalho laboratorial. Use luvas protectoras descartáveis, batas de laboratório e protecção para os olhos quando manipular amostras e os reagentes do dispositivo. Lave cuidadosamente as mãos depois de manipular amostras e reagentes do dispositivo.
- Evite a contaminação microbiana e por ribonucleases dos reagentes quando remover as alíquotas dos frascos de controlo.
- Recomenda-se a utilização de pipetas e de pontas de pipeta isentas de DNase esterilizadas e descartáveis.
- Não misture controlos de lotes diferentes nem de frascos diferentes do mesmo lote.
- Não misture cassetes de reagente nem controlos de dispositivos diferentes.
- Não abra cassetes COBAS AmpliPrep nem troque, misture, retire ou acrescente frascos.
- Elimine os reagentes não utilizados, resíduos e amostras em conformidade com as regulamentações nacionais, federais, estaduais e locais.
- Não utilize um dispositivo fora do prazo de validade.
- Encontram-se disponíveis Folhas de Dados de Segurança dos Materiais (Material Safety Data Sheets = MSDS) que devem ser solicitadas ao seu representante local da Roche.
- As amostras deverão ser manipuladas como se estivessem infectadas, utilizando procedimentos de laboratório seguros, tais como os delineados em Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories<sup>33</sup> e no Documento M29-A<sup>34</sup> do CLSI. Limpe e desinfete completamente todas as superfícies de trabalho com uma solução preparada de fresco de hipoclorito de sódio a 0,5% em água desionizada ou destilada.



**NOTA:** A lixívia líquida caseira comercial contém habitualmente hipoclorito de sódio numa concentração de 5,25%. Uma diluição da lixívia caseira de 1:10 irá dar origem a uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%.

- N. **ATENÇÃO:** CTM (-) C, HBV L(+/-)C e HBV H(+/-)C contêm Plasma Humano derivado do sangue humano. O material de origem foi submetido a testes e considerado como não reactivo para a presença de Antígeno de Superfície da Hepatite B (HBsAg), anticorpos contra o HIV-1/2 e o HCV, e antígeno p24 do HIV. O Teste de Plasma Humano Negativo por métodos de PCR não evidenciou qualquer ARN do HIV-1, ARN do HCV ou ADN do HBV detectável. Nenhum método de teste conhecido pode oferecer uma garantia completa de que os produtos derivados do sangue humano não transmitirão agentes infecciosos. Por conseguinte, todo o material de origem humana deverá ser considerado como potencialmente infeccioso. CTM (-) C, HBV L(+/-)C e HBV H(+/-)C deverão ser manipulados como se estivessem infectados, utilizando procedimentos de laboratório seguros, tais como os delineados em *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*® e no Documento M29-A34 do CLSI. Limpe e desinfete completamente todas as superfícies de trabalho (para as superfícies de trabalho do Instrumento consulte o Manual do Instrumento COBAS AmpliPrep para utilização com o Analisador COBAS TaqMan ou Analisador COBAS TaqMan 48 e Software AMPLI LINK, Série da Versão 3.1.0) com uma solução preparada de fresco de hipoclorito de sódio a 0,5% em água desionizada ou destilada.
- O. HBV QS, HBV Mn2+ e HBV MMX contêm azida sódica. A azida sódica pode reagir com tubagens de chumbo e cobre, formando azidas metálicas altamente explosivas. Ao eliminar soluções com azida sódica pela canalização do laboratório, lave os canos com água em abundância, de modo a evitar a acumulação de azidas.
- P. Use protecção para os olhos, batas de laboratório e luvas descartáveis quando manipular qualquer reagente. Evite o contacto destes materiais com a pele, olhos ou membranas mucosas. Caso ocorra contacto, lave imediatamente com uma grande quantidade de água. Caso não seja efectuado tratamento, podem surgir queimaduras. Caso ocorra derramamento destes reagentes, dilua com água antes de limpar.
- Q. Não permita que HBV CS2 e resíduos líquidos do Instrumento COBAS AmpliPrep, que contêm tiosulfato de guanidina, entrem em contacto com a solução de hipoclorito de sódio (lixívia). Estas misturas podem produzir um gás altamente tóxico.
- R. Ao eliminar Unidades de Processamento de Amostra (SPUs) COBAS AmpliPrep já usadas, que contêm tiosulfato de guanidina, evite qualquer contacto com a solução de hipoclorito de sódio (lixívia). Estas misturas podem produzir um gás altamente tóxico.

#### REQUISITOS DE ARMAZENAMENTO E MANIPULAÇÃO

- A. **Não congele os reagentes nem controlos.**
- B. Armazene HBV CS1, HBV CS2, HBV CS3 e HBV CS4 entre 2 e 8°C. Fechados, estes reagentes mantêm-se estáveis até ao fim do prazo de validade indicado. Uma vez abertos, estes reagentes mantêm-se estáveis durante 28 dias entre 2 e 8°C ou até ao fim do prazo de validade indicado, o que primeiro se verificar. HBV CS1, HBV CS2, HBV CS3 e HBV CS4 podem ser usados durante um número máximo de 4 ciclos do instrumento, até um número máximo de 64 horas acumuladas dentro do Instrumento COBAS AmpliPrep. Os reagentes devem ser armazenados entre 2 e 8°C entre os ciclos do instrumento.
- C. Armazene HBV H(+/-)C, HBV L(+/-)C e CTM (-) C entre 2 e 8°C. Os controlos mantêm-se estáveis até ao fim do prazo de validade indicado. Uma vez aberta, qualquer porção não utilizada deverá ser eliminada.
- D. Armazene os cliques de Códigos de Barras [HBV H(+/-)C Clip, HBV L(+/-)C Clip e HBV (-) C Clip] entre 2 e 30°C.
- E. Armazene PG WR entre 2 e 30°C. PG WR permanece estável até ao fim do prazo de validade indicado. Uma vez aberta, este reagente mantém-se estável durante 28 dias entre 2 e 30°C, ou até ao fim do prazo de validade indicado, o que primeiro se verificar.

#### MATERIAIS FORNECIDOS

- A. COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test (P/N: 03587819 190)

HBV CS1  
(Cassete de Reagente de Partículas Magnéticas de Vidro HBV)  
HBV CS2  
(Cassete de Reagente de Lise do HBV)

HBMCAP

9

- HBV CS3  
(Cassete de Multi-Reagente do HBV)  
HBV CS4  
(Cassete de Reagente Específica de Teste HBV)  
HBV H(+/-)C  
(Controlo Positivo Alto do HBV)  
HBV L(+/-)C  
(Controlo Positivo Baixo do HBV)  
CTM (-) C  
(Controlo Negativo (Plasma Humano) COBAS TaqMan)  
HBV H(+/-)C Clip  
(Clipe de Códigos de Barras de Controlo Positivo Alto do HBV)  
HBV L(+/-)C Clip  
(Clipe de Códigos de Barras de Controlo Positivo Baixo do HBV)  
HBV (-) C Clip  
(Clipe de Códigos de Barras de Controlo Negativo do HBV)
- B. COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan Wash Reagent (P/N: 03587819 190)
- PG WR  
(Reagente de Lavagem COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan)

PG WR

#### MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

##### Instrumentação e Software

- Instrumento COBAS AmpliPrep
- Analisador COBAS TaqMan ou Analisador COBAS TaqMan 48
- Opcional: Estação de Ancoragem
- Software AMPLI LINK, v3.1 ou superior
- Estação de dados para o software AMPLI LINK, com impressora
- Manual do Instrumento COBAS AmpliPrep para utilização com o Analisador COBAS TaqMan ou Analisador COBAS TaqMan 48 e o Software AMPLI LINK IVD, Série da Versão 3.1.0.
- Manual do Instrumento Analisador COBAS TaqMan (mais Estação de Ancoragem opcional) para utilização com o Software AMPLI LINK Série da Versão 3.1.0.
- Manual do Instrumento Analisador COBAS TaqMan 48 para utilização com o Software AMPLI LINK Série da Versão 3.1.0.
- Manual de Aplicação para o Software AMPLI LINK Série da Versão 3.1.0, para utilização com o Instrumento COBAS AmpliPrep e com o Analisador COBAS TaqMan e com o Analisador COBAS TaqMan 48.
- CD-ROM de ficheiros de testes PCR do HBV do Analisador COBAS TaqMan (P/N: 03610071190)
- CD-ROM de ficheiros de testes PCR do HBV do Analisador COBAS TaqMan 48 (P/N: 04416716190)

##### Consumíveis

- Unidades de processamento de amostras: SPU (P/N: 03755525001)
- Tubos de entrada de amostras (tubos-S) com cliques de código de barras (P/N: 03137040001)
- Suportes de pontas-K (P/N: 03287343001)
- Caixa de tubos-K de 12 x 96 (P/N: 03137082001)

#### OUTROS MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Suporte de Amostras (24 Suportes SK) (P/N: 28122172001)
- Suporte de Reagentes (P/N: 28122199001)
- Suporte SPU (P/N: 28122806001)
- Aplicador de tampas em tubos-K, motorizado (P/N: 03516590001)
- Aplicador de tampas em tubos-K (P/N: 03339874001)
- Portador-K (P/N: 28150397001)

10

- Transportador do portador-K (P/N: 03517519001)
- Suporte do portador-K (P/N: 03286439001)
- Pipetas com pontas com barreira para aerossóis ou de deslocamento positivo isentas de DNase (capacidade de 1000 µl)
- Luvas descartáveis, sem pó
- Misturador de vórtice
- A precisão das pipetas deve estar incluída dentro de 3% do volume declarado. Devem ser usadas pontas com barreira para aerossóis ou de deslocamento positivo e isentas de DNase sempre que tal for especificado, para impedir a contaminação cruzada das amostras.

#### COLHEITA, TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

**NOTA:** Manipule todas as amostras como se estas fossem capazes de transmitir agentes infecciosos.

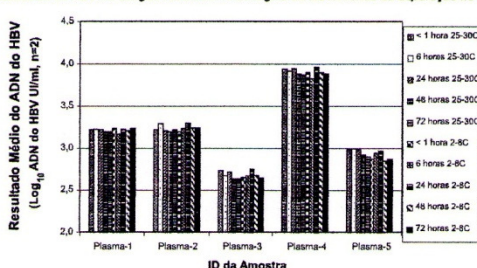
**NOTA:** Este teste foi validado apenas para utilização com plasma humano colhido no anticoagulante EDTA. O teste de outros tipos de amostras pode dar origem a resultados imprecisos.

##### A. Colheita das amostras

O Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV destina-se a ser utilizado apenas com amostras de plasma. O sangue deve ser colhido em tubos esterilizados com EDTA (topo lila) como anticoagulante.

Armazene o sangue total entre 2 e 25°C durante um período não superior a 24 horas. Separe o plasma do sangue total durante 1 dia subsequente à colheita, por centrifugação a 800-1600 x g durante 20 minutos à temperatura ambiente. Transfira o plasma para um tubo de polipropileno esterilizado. A Figura 4 apresenta os dados de um estudo de colheita de amostras (Este estudo foi efectuado utilizando o Teste COBAS TaqMan HBV para utilização com o Sistema High Pure).

**Figura 4**  
Estabilidade do HBV no Sangue Total com Anticoagulante EDTA Antes de Separação no Plasma



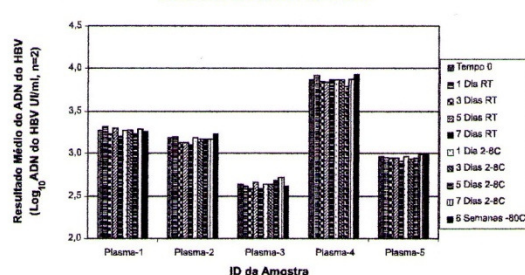
##### B. Transporte da amostra

O transporte de sangue total ou plasma deve obedecer às regulamentações nacionais, federais, estatais e locais relativas ao transporte de agentes etiológicos<sup>35</sup>. O sangue total tem de ser transportado entre 2 e 25°C e centrifugado no prazo de 1 dia subsequente à colheita. O plasma pode ser transportado entre 2 e 8°C ou congelado entre -20°C e -80°C.

##### C. Armazenamento das amostras

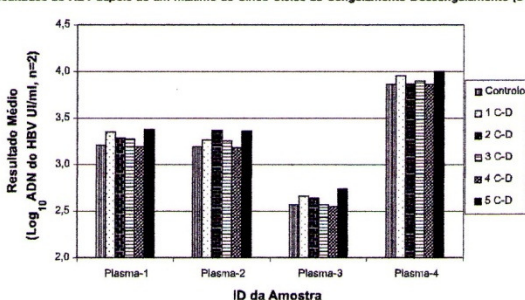
As amostras de plasma podem ser armazenadas à temperatura ambiente (25-30°C) durante 3 dias, entre 2 e 8°C durante um máximo de 7 dias ou congeladas entre -20°C e -80°C durante um período mínimo de seis semanas. Recomenda-se que as amostras sejam armazenadas em alíquotas de 1100-1200 µl, em tubos de polipropileno esterilizados de 2,0 ml, com tampas de enrosca (tais como Sarstedt 72.684.006). A Figura 5 apresenta os dados de um estudo de armazenamento de amostras (Este estudo foi efectuado utilizando o Teste COBAS TaqMan HBV para utilização com o Sistema High Pure).

**Figura 5**  
Estabilidade do HBV em Plasma EDTA



As amostras de plasma podem ser congeladas e descongeladas até um número máximo de cinco vezes sem perda de ADN do HBV. Na Figura 6 apresentam-se os dados de um estudo de congelamento/descongelamento (Este estudo foi efectuado utilizando o Teste COBAS TaqMan HBV para utilização com o Sistema High Pure).

**Figura 6**  
Resultados do HBV depois de um máximo de Cinco Ciclos de Congelamento-Descongelamento (C-D)



## Amplificação e Detecção

### Configuração do Analisador COBAS TaqMan ou Analisador COBAS TaqMan 48

O processamento no Analisador COBAS TaqMan ou no Analisador COBAS TaqMan 48 tem que ser iniciado no prazo de 120 minutos após a conclusão da preparação da amostra e controle.

**NOTA:** NÃO CONGELE nem ARMAZENE amostras e controles processados entre 2 e 8°C.

Para uma descrição detalhada das possíveis configurações, consulte o (a) Manual do Instrumento para o Analisador COBAS TaqMan (mais Estação de Ancoragem opcional) para utilização com o Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1.0; (b) o Manual do Instrumento para o Analisador COBAS TaqMan 48 para utilização com o Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1.0 e a Parte C deste Folheto Informativo.

### Parte G. Carga de Amostras Processadas

G1. Dependendo da configuração do instrumento, execute os passos adequados para transferir os tubos-K para o Analisador COBAS TaqMan ou Analisador COBAS TaqMan 48:

- Configuração 1: Transferência automatizada de portador-K através da Estação de Ancoragem para o Analisador COBAS TaqMan. A intervenção manual é desnecessária.
- Configuração 2 e 5: Transferência manual de tubos-K em suporte ou suportes de amostras para o Analisador COBAS TaqMan
- Configuração 3, 4 e 5: Transferência manual de portador-K em suporte ou suportes de portador-K para o Analisador COBAS TaqMan 48. Transferência manual de portadores-K para o Analisador COBAS TaqMan 48 utilizando o Transportador portador-K.

### Parte H. Início do Processamento no Analisador COBAS TaqMan

H1. Ligue o Analisador COBAS TaqMan ou o Analisador COBAS TaqMan 48 utilizando uma das opções em baixo, consoante a configuração utilizada:

- Configuração 1: Não é necessária qualquer intervenção.
- Configuração 2 e 5: Arranque automático do Analisador COBAS TaqMan depois da introdução de suporte ou suportes de amostras.
- Configuração 3, 4 e 5: Encha o portador-K com tubos-K vazios se existirem menos de 6 tubos-K no portador. O enchimento é orientado pelo software AMPLILINK. Abra o termociclador, carregue o portador-K no termociclador e feche a tampa. Inicie o processamento no Analisador COBAS TaqMan 48.

### Parte I. Final do Processamento no Analisador COBAS TaqMan

I1. Após a conclusão do processamento no Analisador COBAS TaqMan ou Analisador COBAS TaqMan 48, imprima o Relatório dos Resultados. Verifique se existem indicadores ou mensagens de erro no relatório de Resultados, conforme descrito no (a) Manual do Instrumento para o Analisador COBAS TaqMan (mais Estação de Ancoragem opcional) para utilização com o Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1.0; (b) o Manual do Instrumento para o Analisador COBAS TaqMan 48 para utilização com o Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1.0 e (c) Manual da Aplicação do Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1 para utilização com o Instrumento COBAS AmpliPrep, Analisador COBAS TaqMan ou com o Analisador COBAS TaqMan 48. As amostras com indicadores e comentários são interpretadas conforme descrito na secção Resultados. Depois de os aceitar, armazene os dados no arquivo.

I2. Remova os tubos-K usados do Analisador COBAS TaqMan ou do Analisador COBAS TaqMan 48.

## RESULTADOS

O Analisador COBAS TaqMan ou o Analisador COBAS TaqMan 48 determina automaticamente a concentração de ADN do HBV para as amostras e controles. A concentração de ADN do HBV é expressa em Unidades Internacionais (UI)/mL. O fator de conversão entre cópias/mL do HBV e UI/mL do HBV é 5,82 cópias/UI utilizando o Padrão Internacional da OMS para o ADN do vírus da Hepatite B para Testes com Ensaios de Tecnologia de Ácidos Nucleicos (NAT) (NIBSC 97/748)<sup>29</sup>.

Se for necessário, os resultados podem ser convertidos manualmente para cópias/mL, utilizando o cálculo de conversão, da seguinte forma:

Concentração de ADN do HBV em UI/mL x 5,82 cópias/UI = ADN do HBV em cópias/mL  
Exemplo: 1,23E+04 UI/mL x 5,82 cópias/UI = 7,16E+04 cópias/mL

### Software AMPLILINK:

- Determina o valor de limite do ciclo (Ct) para o ADN do HBV e para o ADN do PQ do HBV.
- Determina a concentração de ADN do HBV com base nos valores de Ct para o ADN do HBV e para o ADN do PQ do HBV e os coeficientes de calibragem específicos para o lote fornecidos nos códigos de barras da casseta.
- Determina que as UI/mL calculadas para HBV L(+)+C e HBV H(+)+C se encontram dentro dos limites atribuídos.

### Validação do Lote

Examine a janela de resultados do software AMPLILINK ou o impresso para procurar indicadores e comentários para assegurar que o lote é válido.

**NOTA:** Para obter instruções sobre os resultados da impressão e sobre a interpretação dos indicadores e comentários, consulte o seguinte: (a) Manual da Aplicação do Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1 para utilização com o Instrumento COBAS AmpliPrep, Analisador COBAS TaqMan ou com o Analisador COBAS TaqMan 48, ou (b) Manual do Instrumento COBAS AmpliPrep para utilização com o Analisador COBAS TaqMan ou com o Analisador COBAS TaqMan 48 e o Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1.0 e (c) Manual do Instrumento para o Analisador COBAS TaqMan (mais Estação de Ancoragem opcional) para utilização com o Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1.0 ou (d) o Manual do Instrumento para o Analisador COBAS TaqMan 48 para utilização com o Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1.0.

Para pedidos de controlo, é feita uma verificação para determinar se o valor de UI/mL para o controlo está dentro do seu intervalo especificado. Se o valor de UI/mL para o controlo cair fora do seu intervalo, é produzido um indicador (FLAG) para mostrar que o controlo falhou.

O lote é válido se não aparecer nenhum indicador para nenhum dos controlos [HBV L(+)+C, HBV H(+)+C e CTM (-) C].

O lote não é válido se aparecer algum dos seguintes indicadores para os controlos do HBV:

### Controlo Negativo:

Indicador	Resultado	Interpretação
__N_NC_INVALID	Invalid	Um resultado inválido ou um resultado "válido" que não era negativo para o alvo do HBV

### Controlo Positivo Baixo do HBV:

Indicador	Resultado	Interpretação
__L_LPCINVALID	< 1.20E+01 IU/mL	Controlo abaixo do intervalo
__L_LPCINVALID	Target Not Detected	Controlo abaixo do intervalo
__L_LPCINVALID	Um título numérico, X.XXE+XX IU/mL	Controlo fora do intervalo
__L_LPCINVALID	> 1.10E+08 IU/mL	Controlo acima do intervalo
__L_LPCINVALID	Invalid	Um resultado inválido

### Controlo Positivo Alto do HBV:

Indicador	Resultado	Interpretação
__H_HPCINVALID	< 1.20E+01 IU/mL	Controlo abaixo do intervalo
__H_HPCINVALID	Target Not Detected	Controlo abaixo do intervalo
__H_HPCINVALID	Um título numérico, X.XXE+XX IU/mL	Controlo fora do intervalo
__H_HPCINVALID	> 1.10E+08 IU/mL	Controlo acima do intervalo
__H_HPCINVALID	Invalid	Um resultado inválido

Caso o lote seja inválido, repita todo o lote, incluindo preparação, amplificação e deteção da amostra e do controlo.

### Interpretação dos Resultados:

Para um lote válido, verifique cada amostra individual para indicadores ou comentários na impressão dos resultados. Interprete os resultados da seguinte forma:

⇒ Um lote válido pode incluir resultados de amostras válidos e inválidos dependendo do facto de serem obtidos indicadores e/ou comentários para as amostras individuais.

Os resultados da amostra interpretam-se da seguinte forma:

Resultado do Título	Interpretação
Target Not Detected	Valor de Ct para HBV acima do limite para o ensaio ou nenhum valor de Ct para HBV obtido. Reporte os resultados como "ADN do HBV não detectado".
< 1.20E+01 IU/mL	UI/mL calculadas encontram-se abaixo do Limite de Deteção do ensaio. Reporte os resultados como "ADN do HBV detectado, menos de 12 UI/mL de ADN do HBV"
≥ 1.20E+01 IU/mL e < 5.45E+01 IU/mL	Os resultados IU/mL calculados são inferiores ao Limite Inferior do Intervalo Linear do teste. Estes resultados possuem um elevado grau de variabilidade, não podendo por isso ser considerados precisos. Estes resultados devem ser interpretados com cuidado.
≥ 5.45E+01 IU/mL e < 1.10E+08 IU/mL	Os resultados calculados superiores ou iguais a 54,5 IU/mL e inferiores ou iguais a 1,10E+08 IU/mL estão dentro do Intervalo Linear do teste.
> 1.10E+08 IU/mL	UI/mL calculadas encontram-se acima do limite do ensaio. Reporte os resultados como "superior a 1,10E+08 UI/mL de ADN do HBV". Se forem desejados resultados quantitativos a amostra original deve ser diluída com plasma EDTA humano negativo para HBV e o teste repetido. Multiplique o resultado reportado pelo factor de diluição.

**NOTA:** Amostras acima do intervalo do ensaio também podem produzir um resultado inválido com um indicador "QS\_INVALID". Caso se desejem resultados quantitativos para estas amostras, a amostra de plasma original deverá ser diluída com plasma EDTA humano negativo para o HBV e o teste deve ser repetido. Multiplique o resultado apresentado pelo factor de diluição.

### CONTROLO DE QUALIDADE

Em cada lote de testes, tem de incluir-se uma réplica do Controlo Negativo COBAS TaqMan, uma réplica do Controlo Positivo Baixo HBV e uma réplica do Controlo Positivo Alto HBV. O lote é válido caso não apareçam quaisquer indicadores para qualquer dos controlos [HBV L(+)+C, HBV H(+)+C e CTM (-) C].

Não existe qualquer exigência relativamente à posição dos controlos no suporte de amostras.

Verifique a impressão do lote para analisar indicadores e comentários, a fim de assegurar que o lote seja válido. Para obter instruções detalhadas sobre os resultados da impressão e sobre a interpretação dos indicadores e comentários, consulte os manuais do instrumento que se seguem: (a) Manual da Aplicação do Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1 para utilização com o Instrumento COBAS AmpliPrep, Analisador COBAS TaqMan ou com o Analisador COBAS TaqMan 48 e (b) Manual do Instrumento para o Analisador COBAS TaqMan (mais Estação de Ancoragem opcional) para utilização com o Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1.0 ou (c) o Manual do Instrumento para o Analisador COBAS TaqMan 48 para utilização com o Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1.0.

### Controlo Negativo

O CTM (-) C deve produzir um resultado "Target Not Detected" (alvo não detectado). Se o CTM (-) C apresentar um indicador de inválido, todo o lote é inválido. Repita todo o processo (preparação da amostra e controlo, amplificação e deteção). Se o CTM (-) C for consistentemente inválido em lotes múltiplos, contacte o seu representante local da Roche, para obter assistência técnica.

### Controlos Positivos

O limite atribuído para HBV L(+)+C e HBV H(+)+C é específico para cada lote de reagentes, e é fornecido nos códigos de barras da casseta de reagente do Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV.

As UI/mL do ADN do HBV para HBV L(+)+C e HBV H(+)+C devem estar dentro dos seus limites atribuídos. Se um ou ambos os controlos positivos apresentarem indicador de inválido, todo o lote é considerado inválido. Todo o procedimento deverá ser repetido (preparação da amostra e do controlo, amplificação e deteção). Se o título de ADN do HBV de um ou de ambos os controlos positivos estiver consistentemente fora dos limites atribuídos em lotes múltiplos, contacte o seu representante local da Roche para obter assistência técnica.

### PRECAUÇÕES DURANTE O PROCEDIMENTO

1. A semelhança do que sucede com qualquer procedimento de teste, a prática de uma boa técnica laboratorial é essencial para um desempenho adequado do ensaio.

### LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- Este teste foi validado para utilização exclusiva com amostras de plasma humano colhidas nem anticoagulante EDTA. A utilização de outro tipo de amostras pode dar origem a resultados imprecisos.
- A obtenção de resultados fidedignos está dependente da execução de procedimentos adequados de colheita, transporte, armazenamento e processamento das amostras.
- A presença de enzima AmpErase na Mistura Principal do COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV reduz o risco de contaminação do amplicon. Todavia, a contaminação proveniente dos controlos positivos do HBV e de amostras clínicas só pode ser evitada através do cumprimento de boas práticas laboratoriais e de um cuidadoso cumprimento dos procedimentos especificados neste Folheto Informativo.
- A utilização deste produto deverá ser restringida a pessoal treinado nas técnicas de PCR.
- Este produto pode ser utilizado apenas com o Instrumento COBAS AmpliPrep e com o Analisador COBAS TaqMan ou com o Analisador COBAS TaqMan 48.



## INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

**NOTA:** Para obter instruções de funcionamento detalhadas, consulte: (a) o Instrumento COBAS AmpliPrep, Manual para utilização com o Analisador COBAS TaqMan ou Analisador COBAS TaqMan 48 e o Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1.0; (b) o Manual do Instrumento Analisador COBAS TaqMan (mais Estação de Ancoragem opcional) para utilização com o Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1.0 ou (c) o Manual do Instrumento Analisador COBAS TaqMan 48 para utilização com o Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1.0.

### Tamanho do lote:

Cada dispositivo contém reagentes suficientes para 48 testes, que podem ser efectuados em lotes de 12 ou 24 testes. Recomenda-se a inclusão de pelo menos uma réplica cada de CTM (-) C, HBV L(+)/C e HBV H(+)/C em cada lote de 12 ou 24 amostras (ver a secção "Controlo de Qualidade").

### Fluxo do Trabalho:

O processamento no Analisador COBAS TaqMan ou no Analisador COBAS TaqMan 48 tem que ser iniciado no prazo de 120 minutos após a conclusão da preparação da amostra e controlo.

**NOTA:** NÃO CONGELE nem ARMAZENE amostras e controlos processados entre 2 e 8°C.

### Preparação da Amostra e do Controlo

**NOTA:** Se estiver a utilizar amostras congeladas, coloque-as à temperatura ambiente até ficarem completamente descongeladas e misture com agitação forte durante 3 a 5 segundos antes de utilizar. Os controlos devem ser removidos do armazenamento entre 2 e 8°C e equilibrados à temperatura ambiente antes de utilizar.

### Configuração do Instrumento COBAS AmpliPrep

#### Parte A. Manutenção e Purga

- O Instrumento COBAS AmpliPrep está pronto para funcionar em modo de em espera (stand-by).
- Ligue a estação de dados do software AMPLILINK (ON). Prepare a estação de dados da seguinte forma:
  - Entre no sistema Windows® XP.
  - Clique duas vezes no ícone do software AMPLILINK.
  - Entre no software AMPLILINK introduzindo a identificação de utilizador e a palavra de passe.
- Verifique a quantidade do PG WR através do ecrã Status e substitua, caso seja necessário.
- Realize toda a manutenção que está enumerada na "Due Tab" (Tabulação Devida), delineada no Manual do Instrumento COBAS AmpliPrep para utilização com o Analisador COBAS TaqMan ou com o Analisador COBAS TaqMan 48 e o Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1.0. O instrumento COBAS AmpliPrep preparará automaticamente o sistema.

#### Parte B. Carga das Cassetes de Reagente

**NOTA:** Todas as cassetes de reagente devem ser retiradas do armazenamento entre 2 e 8°C, carregadas imediatamente no Instrumento COBAS AmpliPrep e deixadas equilibrar à temperatura ambiente no instrumento pelo menos 30 minutos antes da primeira amostra estiver para ser processada. Não deixe que as cassetes de reagente atinjam a temperatura ambiente fora do instrumento, dado que se pode formar condensação nas etiquetas com códigos de barras. Não limpe a condensação caso esta apareça nas etiquetas com códigos de barras.

- Coloque HBV CS1 num suporte de reagentes. Coloque HBV CS2, HBV CS3 e HBV CS4 num suporte de reagentes diferente.
- Carregue o suporte de reagentes contendo HBV CS1 na posição A do suporte do Instrumento COBAS AmpliPrep, tal como descrito no Manual do Instrumento COBAS AmpliPrep para utilização com o Analisador COBAS TaqMan ou com o Analisador COBAS TaqMan 48 e o Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1.0.
- Carregue o suporte de reagentes contendo HBV CS2, HBV CS3 e HBV CS4 na posição B, C, D ou E do suporte do Instrumento COBAS AmpliPrep, tal como descrito no Manual do Instrumento COBAS AmpliPrep para utilização com o Analisador COBAS TaqMan ou com o Analisador COBAS TaqMan 48 e o Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1.0 (ver também a Tabela 1 para mais informações).

## Parte C. Carga de Descartáveis

**NOTA:** Determine o número de cassetes de reagente COBAS AmpliPrep, de unidades de processamento de amostras (SPUs), tubos de entrada para amostras (tubos-S), pontas-K e tubos-K necessários. Para cada amostra ou controlo são necessários uma SPU, um tubo-S de entrada, uma ponta-K e um tubo-K.

São possíveis múltiplas configurações para a utilização do Instrumento COBAS AmpliPrep com o Analisador COBAS TaqMan ou com o Analisador COBAS TaqMan 48. Para referência, consulte a Tabela abaixo. Dependendo da configuração utilizada, carregue o número adequado de suportes de cassetes de reagentes, suportes de amostra com tubos-S de entrada, suportes de SPU, suportes de pontas-K, suportes de tubos-K e portadores-K em suportes de transportadores-K nas posições do suporte respectivas do Instrumento COBAS AmpliPrep, tal como descrito no Manual do Instrumento COBAS AmpliPrep para utilização com o Analisador COBAS TaqMan ou com o Analisador COBAS TaqMan 48 e o Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1.0 (ver também a Tabela 1 para mais informações).

- Coloque as SPUs no suporte ou suportes para SPU e carregue o suporte ou suportes na posição J, K ou L do Instrumento COBAS AmpliPrep, tal como descrito no Manual do Instrumento COBAS AmpliPrep para utilização com o Analisador COBAS TaqMan ou com o Analisador COBAS TaqMan 48 e o Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1.0.
- Dependendo da configuração utilizada, carregue o suporte ou suportes completos de tubos-K na posição M, N, O ou P do Instrumento COBAS AmpliPrep, tal como descrito no Manual do Instrumento COBAS AmpliPrep para utilização com o Analisador COBAS TaqMan ou com o Analisador COBAS TaqMan 48 e o Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1.0.
- Carregue o suporte ou suportes completos de pontas-K na posição M, N, O ou P do suporte do Instrumento COBAS AmpliPrep, tal como descrito no Manual do Instrumento COBAS AmpliPrep para utilização com o Analisador COBAS TaqMan ou com o Analisador COBAS TaqMan 48 e o Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1.0.
- Para as configurações 3 ou 5 utilizando o Analisador COBAS TaqMan 48, carregue os portadores-K no suporte ou suportes de portadores-K na posição M, N, O ou P do Instrumento COBAS AmpliPrep, tal como descrito no Manual do Instrumento COBAS AmpliPrep para utilização com o Analisador COBAS TaqMan ou com o Analisador COBAS TaqMan 48 e o Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1.0.

13

14

**Tabela 1**  
Configurações Possíveis para utilização do Instrumento COBAS AmpliPrep com o Analisador COBAS TaqMan ou Analisador COBAS TaqMan 48

Configuração	Modo de transferência para o Analisador COBAS TaqMan ou Analisador COBAS TaqMan 48	Suportes, portadores e descartáveis	Posição no Instrumento COBAS AmpliPrep
1. Instrumento COBAS AmpliPrep mais Estação de Ancoragem mais Analisador COBAS TaqMan	Transferência automatizada do portador-K	Tubos-K em suportes completos para tubos-K Pontas-K em suportes completos para pontas-K Tubos-S de entrada contendo amostras e controlos em suportes de amostra SPUs em suportes para SPU CS1 no suporte para Cassete CS2, CS3, CS4 no suporte para Cassete	M-P M-P F-H J-L A B-E
2. Instrumento COBAS AmpliPrep mais Analisador COBAS TaqMan	Transferência manual do tubo-K através de suporte ou suportes para amostras para o Analisador COBAS TaqMan	Tubos-K em suportes completos para tubos-K Pontas-K em suportes completos para pontas-K Tubos-S de entrada em suportes de amostra SPUs em suportes para SPU CS1 no suporte para Cassete CS2, CS3, CS4 no suporte para Cassete Após conclusão do processamento da amostra: Tubos-K em suportes de amostra (preparado para transferência manual)	M-P M-P F-H J-L A B-E Idêntico ao de cima (F-H)
3. Instrumento COBAS AmpliPrep mais 1-2 Analisador(s) COBAS TaqMan 48	Transferência manual do portador-K através de suporte ou suportes para portador-K para o Analisador COBAS TaqMan 48	Tubos-K em suportes de amostra Pontas-K em suportes completos para pontas-K Tubos-S de entrada em suportes de amostra SPUs em suportes para SPU CS1 no suporte para Cassete CS2, CS3, CS4 no suporte para Cassete Portador-K com códigos de barras visíveis no suporte para portador-K Após conclusão do processamento da amostra: Tubos-K em portador-K no suporte para portador-K	F-H M-P F-H J-L A B-E M-P Idêntico ao de cima (M-P)
5. Instrumento COBAS AmpliPrep mais Analisador COBAS TaqMan mais Analisador COBAS TaqMan 48	Transferência manual de tubo-K através de suporte ou suportes para amostras para o Analisador COBAS TaqMan 48 Transferência manual do portador-K através de suporte para portador-K para o Analisador COBAS TaqMan 48	Idêntico às configurações 2 e 3	Idêntico às configurações 2 e 3

## Parte D. Carga e Pedido de Amostras

- Prepare suportes de amostra da seguinte forma: Preencha um clipe de etiqueta de código de barras a cada posição de amostra no suporte onde se deverá colocar uma amostra (tubo-S). Preencha um dos cliques de etiqueta com códigos de barras específico para os controlos [CTM (-) C, HBV L(+)/C e HBV H(+)/C] para cada posição do suporte de amostras onde serão colocados os controlos (tubo-S). Os cliques com etiqueta com códigos de barras para os controlos devem ter o mesmo número de lote de controlo do que o número de lote presente nos frascos de controlo do dispositivo. Use de precaução para atribuir o controlo adequado à posição com o clipe de códigos de barras de controlo adequado. Coloque um tubo-S de entrada em cada posição contendo um clipe de etiqueta do código de barras.
- Utilizando o software AMPLILINK, crie pedidos de amostras para cada amostra na janela **Orders**, pasta **Sample**. O nome do ficheiro de Teste na janela **Orders** será HBMCAP96 ou HBMCAP48.
- Atribua pedidos de amostra e controlo às posições do suporte de amostras na janela **Orders**, pasta **Sample Rack**. O número do suporte de amostras deve ser para o suporte preparado no passo D1.
- Imprima o relatório **Sample Rack Order** para utilizar como uma folha de trabalho.
- Prepare suportes de amostra e controlo na área designada para a adição de amostras e controlos, da seguinte forma: Misture com agitação forte cada amostra e controlo [CTM (-) C, HBV L(+)/C e HBV H(+)/C] durante 3 a 5 segundos. Evite contaminar as luvas enquanto manipular as amostras e controlos.
- Transfira 1000 a 1050 µl de cada amostra e controlo [CTM (-) C, HBV L(+)/C e HBV H(+)/C] para o tubo-S de entrada identificado com o código de barras adequado utilizando uma micropipeta com uma ponta com baneira para aerosóis ou de deslocamento positivo isenta de DNase. **Evite transferir partículas e/ou códigos de fibrina da amostra original para o tubo-S de entrada.** As amostras e controlos devem ser transferidas para posições de tubos, tal como determinado e registado na folha de trabalho no passo D4. Os cliques com etiqueta com códigos de barras para os controlos devem ter o mesmo número de lote de controlo do que o número de lote presente nos frascos de controlo do dispositivo. Atribua o controlo adequado à posição com o clipe de códigos de barras de controlo adequado. **Evite contaminar a parte superior dos tubos-S com amostras ou controlos.**
- Para as configurações 1 e 2, carregue o suporte ou suportes de amostra cheios com tubos-S de Entrada nas posições do suporte F, G ou H do Instrumento COBAS AmpliPrep.
- Para as configurações 3 a 5 utilizando o Analisador COBAS TaqMan 48, carregue o suporte ou suportes de amostra com tubos-S de Entrada e tubos-K (um para cada tubo-S de Entrada, carregado na posição da direita adjacente aos tubos-S de entrada) na posição do suporte F, G ou H do Instrumento COBAS AmpliPrep conforme descrito no Manual do Instrumento COBAS AmpliPrep para utilização com o Analisador COBAS TaqMan ou com o Analisador COBAS TaqMan 48 e o Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1.0.

## Parte E. Início do Processamento no Instrumento COBAS AmpliPrep

- Ligue o Instrumento COBAS AmpliPrep utilizando o software AMPLILINK, tal como se encontra descrito no Manual da Aplicação do Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1 para utilização com o Instrumento COBAS AmpliPrep, com o Analisador COBAS TaqMan ou com o Analisador COBAS TaqMan 48.

## Parte F. Final do Processamento com o Instrumento COBAS AmpliPrep e Transferência para o Analisador COBAS TaqMan (apenas para as configurações 2-5)

- Verifique se existem indicadores ou mensagens de erro no ecrã do sistema, conforme descrito no (a) Manual do Instrumento COBAS AmpliPrep para utilização com o Analisador COBAS TaqMan ou com o Analisador COBAS TaqMan 48 e o Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1.0 e (b) Manual da Aplicação do Software AMPLILINK, Série da Versão 3.1 para utilização com o Instrumento COBAS AmpliPrep, Analisador COBAS TaqMan ou com o Analisador COBAS TaqMan 48.
- Retire as amostras e controlos processados do Instrumento COBAS AmpliPrep em suportes de amostra (para o Analisador COBAS TaqMan sem Estação de Ancoragem) ou em suportes portador-K (para o Analisador COBAS TaqMan 48), dependendo da configuração (para mais pormenores, ver a Parte G).
- Retire os detritos do Instrumento COBAS AmpliPrep.

**NOTA:** Todas as amostras e controlos processados não devem ser expostas à luz depois da conclusão da preparação da amostra e controlo.

## SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES

Níveis elevados de triglicéridos, de bilirrubina, de albumina, de hemoglobina e de ADN humano nas amostras mostraram **não** interferir com a quantificação do ADN do HBV neste teste.

As combinações de fármacos seguintes testados ao Nível Máximo do Plasma ( $C_{max}$ ) e a 3 vezes o  $C_{max}$  têm mostrado **não** interferir com a quantificação do ADN do HBV pelo Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV.

<b>Inibidores Nucleotídicos da Polimerase do ADN</b> Tenofovir Adefovir dipivoxil	<b>Inibidores Nucleosídicos da Transcriptase Reversa e da Polimerase do ADN</b> Lamivudina Zidovudina Stavudina Abacavir Didanosina
<b>Inibidores da Protease do HIV</b> Indinavir Saquinavir Ritonavir Nelfinavir Amprenavir Lopinavir/Ritonavir	<b>Inibidores Não Nucleosídicos da Transcriptase Reversa do HIV</b> Nevirapina Efavirenz  <b>Inibidor da Fusão do HIV</b> Enfuvirtide
<b>Imuno-Moduladores</b> Interferão alfa-2a Interferão alfa-2b Peginterferão alfa-2a Peginterferão alfa-2a + Ribavirina Interferão alfa-2b + Ribavirina	<b>Anti-depressivos</b> Paroxetina HCl Fluoxetina Sertralina  <b>Compostos para Tratamento da Infecção por CMV</b> Ganciclovir Valganciclovir Acyclovir

## AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO NÃO CLÍNICO

### Descrição do Estudo

O limite de detecção do Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV foi determinado para o ADN do HBV em várias diluições utilizando o Padrão Internacional da OMS para o ADN do vírus da Hepatite B para Testes com Ensaios de Tecnologia de Ácidos Nucleicos (NAT) (NIBSC 97/746)P<sup>3</sup>, genótipo A) e amostras clínicas (representantes dos genótipos A-G) em plasma EDTA humano negativo ao HBV. A precisão e linearidade do Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV foram determinadas por análise de diluições em série de amostras clínicas de HBV (genótipo A) em plasma EDTA humano negativo ao HBV. A atribuição de títulos das amostras clínicas (concentrações de stock) foi efectuada por um método que garante a rastreabilidade ao padrão do HBV da OMS.

### A. Limite de detecção

A concentração de ADN do HBV em plasma EDTA que pode ser detectada com uma taxa de positividade superior a 95%, conforme determinado utilizando análise PROBIT, é de 12 UI/ml (ver a Tabela 2a) ou inferior (ver a Tabela 2b).

**Tabela 2a**  
**Limite de detecção do Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV em plasma EDTA utilizando o Padrão Internacional da OMS**

Entrada Nominal (UI/ml de ADN do HBV)	N.º Réplicas	N.º Positivos	Taxa de Positividade
12,9	50	49	98%
8,6	50	45	90%
6,0	50	44	88%
3,4	50	33	66%
1,7	50	15	30%
0,9	50	8	16%
0,4	50	6	12%
<b>Taxa de Atingimento 95% PROBIT</b>	<b>12 UI/ml</b> [Limites de confiança de 95% de 9,1 - 17,2 UI/ml]		

**Tabela 2b**  
**Limite de detecção do Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV em plasma EDTA utilizando Amostras Clínicas Genotipadas (genótipos A-G)**

Genótipo	TAXA DE ATINGIMENTO 95% PROBIT
A	5,1 UI/ml [Limites de confiança de 95% de 4,5 - 6,2 UI/ml]
B	4,2 UI/ml [Limites de confiança de 95% de 3,5 - 6,2 UI/ml]
C	7,2 UI/ml [Limites de confiança de 95% de 6,0 - 9,4 UI/ml]
D	4,1 UI/ml [Limites de confiança de 95% de 3,6 - 5,0 UI/ml]
E	4,8 UI/ml [Limites de confiança de 95% de 4,2 - 5,8 UI/ml]
F	5,9 UI/ml [Limites de confiança de 95% de 4,9 - 8,1 UI/ml]
G	5,1 UI/ml [Limites de confiança de 95% de 4,1 - 7,7 UI/ml]

### B. Precisão

Todos os dias, foi efectuada uma execução constituída por 6 níveis de diluição e 7 réplicas em cada nível, durante 15 dias. Cada amostra foi submetida ao procedimento completo do Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV, incluindo preparação, amplificação e detecção da amostra. Por conseguinte, a precisão aqui referida diz respeito a todos os aspectos do procedimento do teste. O estudo foi executado para três lotes de reagentes do Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV, e os resultados constam da Tabela 3.

### D. Inclusividade

Foram propostas sete categorias de genótipo para o HBV com base numa divergência de nucleotídicos dentro do genoma superior a 8%<sup>36,37</sup>. Estes genótipos são designados com letras alfabéticas maiúsculas, de A a G. Os genótipos do HBV apresentam distribuições geográficas características<sup>38</sup>.

O desempenho do Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV em genótipos de HBV foi avaliado por análise de 24 ADNs de plasmídeo purificados, linearizados e quantificados, contendo inserções de sequência representativas dos genótipos do HBV A a G (ver a Tabela 4). A atribuição das concentrações nominais das soluções de stock dos plasmídeos foi efectuada pelo método de PicoGreen. Cada ADN de plasmídeo foi diluído em concentrações nominais de 1,0E+05 e 1,0E+07 cópias de PicoGreen/ml em plasma EDTA. As concentrações (UI/ml) foram depois determinadas pelo Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV utilizando um lote de reagente, tendo-se comparado os resultados obtidos para o plasmídeo de controlo (pTSHBV18) e para os outros plasmídeos.

O Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV produziu resultados equivalentes para todos os 24 ADNs de plasmídeo (ver a Figura 8). Os títulos para todos os genótipos e a mutação pré-Core foram concordantes entre si e com o ADN do plasmídeo de controlo.

**Tabela 4**  
**Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV**  
**Teste de Inclusividade - ADN de Plasmídeo Genotipado Testado**

Designação do Plasmídeo	Genótipo	Origem da Espécie Progenitora
p8423-c1	A	Índia
p1115-c1	A	Burundi
p3952-c1	A	Camarões
p4199-c2	A	Noruega
p1764-c1	B	China
p1767-c1	B	China
p3958-c1	B	Ásia Oriental
p830-c1	B	Ilha Society
p3982-c1	B	Vietname
p1786-c1	C	China
p11549-1	C	Bangladesh
p3872-c1	D	Irão
p1103-c1	D	Tunísia
p3953-c2	D	Norte de África
p18-c1	D	Suécia
p30893-5	D	Suécia
p4244-c1	D	Dinamarca
p3217-c1	E	Senegal
p3963-c2	E	Nigéria
p9203-c1	F	Colômbia
p479-c1	F	Venezuela
p1009-c1	F	Espanha
p00042975-4	G	Estados Unidos
pIT1896	Mutante Pré-Core	Itália

21

22

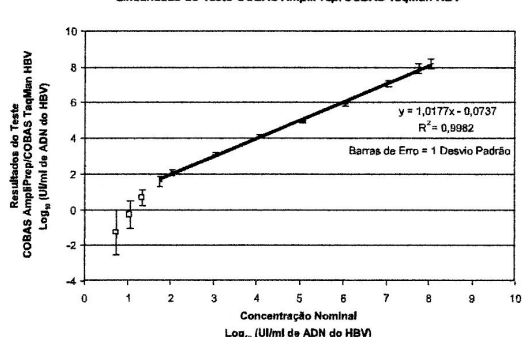
**Tabela 3**  
**Precisão do Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV**

Título (UI/ml)	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	% CV Total	DP Total em log	% CV Total	DP Total em log	% CV Total	DP Total em log
1,00E+02	50	0,16	41	0,13	30	0,13
1,00E+03	19	0,08	19	0,08	19	0,08
1,00E+04	17	0,08	16	0,07	16	0,07
1,00E+05	21	0,08	16	0,07	10	0,04
1,00E+06	29	0,10	12	0,05	16	0,06
1,00E+07	45	0,16	35	0,13	25	0,09

### C. Intervalo Linear

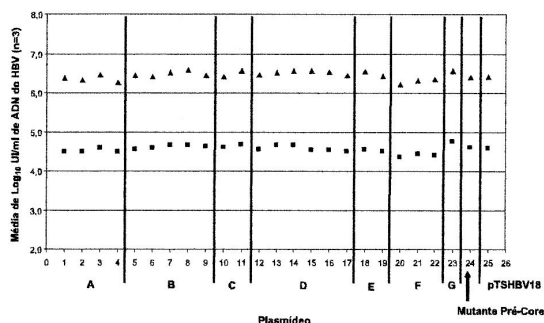
Conforme se mostra na Figura 7, o Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV mostrou produzir uma resposta linear de 54,5 ( $\log_{10} = 1,74$ ) UI/ml de ADN do HBV para pelo menos 1,1E+08 ( $\log_{10} = 8,03$ ) UI/ml de ADN do HBV. O estudo foi executado utilizando um lote de reagentes do Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV, compreendendo 103 - 105 réplicas por nível.

**Figura 7**  
**Linearidade do Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV**





**Figura 8**  
**Desempenho do Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV em Genótipos de HBV A e G e num Mutante Pré-Core**



#### E. Especificidade

A especificidade do Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV foi determinada por análise de EDTA plasma negativo para o HBV proveniente de doadores do sangue. Foi testado um total de 290 amostras individuais de plasma EDTA. Todas as amostras foram negativas para ADN do HBV. Com base nestes resultados, a especificidade do Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV é de 100%.

#### F. Especificidade analítica

A especificidade analítica do Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV foi avaliada adicionando microrganismos em cultura (vírus, bactérias, leveduras) ou ADN (HTLV2) em plasma EDTA humano negativo para o HBV (ver a Tabela 5). Nenhum dos organismos não-HBV testados foi positivo para ADN do HBV.

**Tabela 5**  
**Amostras de Especificidade Analítica**

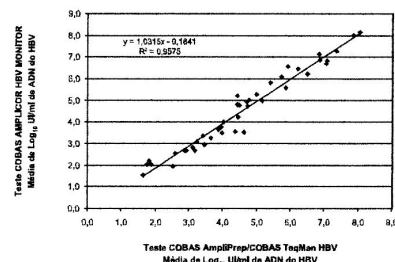
Vírus	Bactérias
Adenovirus tipo 2	Staphylococcus aureus
Cytomegalovirus	Propionibacterium acnes
Vírus de Epstein-Barr	
Vírus do Herpes Humano tipo 6	
Vírus Herpes simplex tipo 1	
Vírus Herpes simplex tipo 2	
Human T-Cell Lymphotropic virus tipo 1	
Human T-Cell Lymphotropic virus tipo 2	
Influenza A	
Vírus da Hepatite A	
Vírus da Hepatite C	
HIV 1b	
	Leveduras
	Candida albicans

25

#### G. Desempenho Comparativamente com o Teste COBAS AMPLICOR HBV MONITOR, com o Teste COBAS TaqMan HBV Para Utilização com o Sistema High Pure e com o Ensaio VERSANT® HBV DNA 3.0

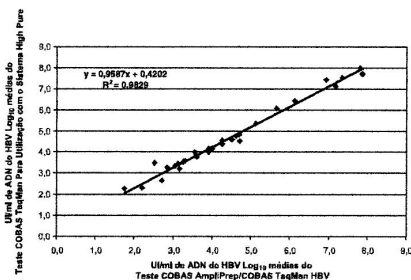
O desempenho do Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV foi comparado com o do Teste COBAS AMPLICOR HBV MONITOR, bem como com o do Teste COBAS TaqMan HBV Para Utilização com o Sistema High Pure e Ensaio VERSANT HBV 3.0 DNA Assay, mediante análise de amostras de plasma provenientes de indivíduos infectados pelo HBV. As amostras foram obtidas junto da Teragenix (Fort Lauderdale, FL). As amostras produzindo resultados acima do intervalo linear do Teste COBAS AMPLICOR HBV MONITOR foram diluídas antes da análise, e os resultados foram multiplicados pelo factor de diluição para se obter o título da amostra original. Os títulos, em cópias/ml, obtidos com o Teste COBAS AMPLICOR HBV MONITOR foram convertidos para UI/ml com o factor de conversão de 5,82 cópias/UI de ADN do HBV. Foi efectuada uma análise de regressão linear com as amostras produzindo resultados dentro do intervalo linear, conforme se mostra nas Figuras 9a a 9c. Os resultados do Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV apresentaram uma elevada correlação com os resultados obtidos com os outros três testes (Teste COBAS AMPLICOR HBV MONITOR, Teste COBAS TaqMan Para Utilização com o Sistema High Pure e ensaio VERSANT HBV DNA 3.0). Ver as Figuras 9a, 9b e 9c, respectivamente.

**Figura 9a**  
**Correlação entre o Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV e o Teste COBAS AMPLICOR HBV MONITOR em Amostras de Plasma de Doentes Infectados pelo HBV (n=42)**

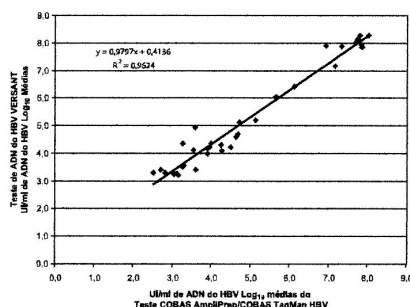


26

**Figura 9b**  
**Correlação entre o Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV e o Teste COBAS TaqMan Para Utilização com o Sistema High Pure em Amostras de Plasma de Doentes Infectados pelo HBV (n=33)**



**Figura 9c**  
**Correlação entre o Teste COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV e o Ensaio VERSANT HBV DNA 3.0 em Amostras de Plasma de Doentes Infectados pelo HBV (n=35)**



#### BIBLIOGRAFIA

- Lee, W. 1997. Hepatitis B Virus Infection. New England Journal of Medicine. 337:1733-1745.
- Beasley, R.P. 1988. Hepatitis B virus - the major etiology of hepatocellular carcinoma. Cancer. 61:1942-1956.
- Wong, D.H.K., Cheung, A.M., O'Rourke, K., et al. 1993. Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B and antigen-positive chronic hepatitis B: a meta-analysis. Annals of Internal Medicine. 119:312-323.
- Zuckerman, A.J. and Lavanchy, D. 1999. Treatment options for chronic hepatitis: antivirals look promising. British Medical Journal. 319:799-800.
- McMahon, B.J. 1998. Chronic carriers of Hepatitis B Virus who clear hepatitis B surface antigen: Are they really "off the hook"? Hepatology. 28:265-267.
- Huo, T., Wu, J., Lee, P. et al. 1998. Sero-clearance of hepatitis B surface antigen in chronic carriers does not necessarily imply a good prognosis. Hepatology. 28:231-236.
- Niederau, C., Heintges, T., Lange, S. et al. 1996. Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alpha for chronic hepatitis B. New England Journal of Medicine. 334:1422-1427.
- Fattovich, G., Giustina, G., Realdi, G. et al. 1997. Long term outcome of hepatitis B e antigen-positive patients with compensated cirrhosis treated with interferon alpha. Hepatology. 26:1338-1342.
- Brown, J.L., Carman, W.F. and Thomas, H.C. 1992. The clinical significance of molecular variation within the hepatitis B virus genome. Hepatology. 15:144-148.
- Hoofnagle, J.H. 1990. Alpha-interferon therapy of chronic hepatitis B. Current status and recommendations. Hepatology. 11:S100-S107.
- Krogsgaard, K., Kryger, P., Aldershvile, J. et al. 1985. Hepatitis B virus DNA in serum from patients with acute hepatitis B. Hepatology. 5:10-13.
- Jardi, R., Buti, M., Rodríguez-Frias, F. et al. 1996. The value of quantitative detection of HBV-DNA amplified by PCR in the study of hepatitis B infection. Journal of Hepatology. 24:680-685.
- Nitsuma, H., Ishii, M., Miura, M. et al. 1997. Low-level hepatitis B viremia detected by polymerase chain reaction accompanies the absence of HBe antigenemia and hepatitis in hepatitis B virus carriers. American Journal of Gastroenterology. 92:115-123.
- Ranki, M., Schatzl, H.M., Zachoval, R. et al. 1995. Quantification of hepatitis B virus DNA over a wide range from serum for studying viral replicative activity in response to treatment and in recurrent infection. Hepatology. 21:1492-1499.
- Mason, A.L., Xu, L., Guo, L. et al. 1998. Molecular basis for persistent hepatitis B virus infection in the liver after clearance of serum hepatitis B surface antigen. Hepatology. 27:1736-1742.
- Saito, T., Shinzawa, H., Uchida, T. et al. 1999. Quantitative DNA analysis of low-level hepatitis B viremia in two patients with serologically negative chronic hepatitis B. Journal of Medical Virology. 58:325-331.
- Brunetto, M.R., Oliveri, F., Rocca, G. et al. 1989. Natural course and response to interferon of chronic hepatitis B accompanied by antibody to hepatitis B e antigen. Hepatology. 10:198-202.
- Saracco, G., Mazzella, G., Rosina, F. et al. 1989. A controlled trial of human lymphoblastoid interferon in chronic hepatitis B in Italy. Hepatology. 10:336-341.
- Perrillo, R., Schiff, R., Davis, G. et al. 1990. A randomized controlled trial of interferon alpha-2b alone and after prednisone withdrawal for the treatment of chronic hepatitis B. New England Journal of Medicine. 323:295-301.
- Perez, V., Tanno, H., Villamil, F. et al. 1990. Recombinant interferon alpha-2b following prednisone withdrawal in the treatment of chronic type B hepatitis. Hepatology. 11:S113-S117.
- Lai, C.-L., Ching, C.-K., Tung, S.K.-M. et al. 1997. Lamivudine is effective in suppressing Hepatitis B virus DNA in Chinese Hepatitis B surface antigen carriers: A placebo-controlled trial. Hepatology. 25:241-244.
- Nagata, I., Colucci, G., Gregorio, G.V. et al. 1999. The role of HBV DNA quantitative PCR in monitoring the response to interferon treatment in chronic hepatitis B virus infection. Journal of Hepatology. 30:965-969.

23. Hadziyannis, S.J., Manesis, E.K., and Papakonstantinou, A. 1998. Oral ganciclovir treatment in chronic hepatitis B virus infection: a pilot study. *Journal of Hepatology*, **31**: 210-214.
24. Marcellin, P., Chang, T.-T., Lim, S.G. et al. 2003. Adefovir Dipivoxil for the treatment of Hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *New England Journal of Medicine*, **348**: 808-816.
25. Puchhammer-Stockl, E., Mandl, C.W., Kletzmayr, J. et al. 2000. Monitoring the virus load can predict the emergence of drug-resistant hepatitis B virus strains in renal transplant patients during lamivudine therapy. *Journal of Infectious Diseases*, **181**: 2063-2066.
26. Longo, M.C., Berninger, M.S. and Hartley, J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**: 125-128.
27. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *BioTechnology* **10**: 413-417.
28. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, J.K., and Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6**: 986-994.
29. Saldanha, J., Gorlich, W., Lelie, N., Dawson, P., Heermann, K., Heath, A., and the WHO Collaborative Study Group. 2001. An international collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques. *Vox Sanguinis* **80**: 63-71.
30. Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R. 2000. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *Journal of General Virology* **81**: 67-74.
31. Smith, E.S., Li, A.K., Wang, A.M., Gelfand, D.H. and Myers, T.M. 2003. Amplification of RNA: High-temperature Reverse Transcription and DNA Amplification with a Magnesium-activated Thermostable DNA Polymerase. PCR Primer, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press: Section 15.
32. Meng, Q., Wong, C., Rangachari, A. et al. 2001. Automated Multiplex Assay System for Simultaneous Detection of Hepatitis B Virus DNA, Hepatitis C Virus RNA, and Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**: 2937-2945.
33. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 1999. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
34. CLSI. Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue. Approved Guideline. CLSI Document M29-A Villanova, PA: CLSI, 1997.
35. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st Edition. 2000. 704 pp.
36. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosasoenignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. 1988. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *Journal of General Virology* **69**: 2575-2583.
37. Norder H, Hammas B, Lofdahl S, Courouce AM, Magnus LO. 1992. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *Journal of General Virology* **73**: 1201-1208.
38. Norder H, Hammas B, Lee SD, Bille K, Courouce AM, Mushahwar IK, Magnus LO. 1993. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. *Journal of General Virology* **74**: 1341-1348.



Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, 08876 USA  
Membro do Grupo Roche



Distributed by

Roche Diagnostics  
Indianapolis, IN 46256 USA  
(For Technical Assistance call the  
Roche Response Center  
toll-free: 1-800 526 1247)  
Roche Diagnostics (Schweiz) AG  
CH-6343 Rotkreuz  
Roche Diagnostics GmbH  
D-68298 Mannheim, Germany

Roche Diagnostics S.L.  
E-08006 Barcelona

Roche Diagnostics  
H7V 4A2 Laval, Quebec  
(For Technical Assistance call:  
Pour toute assistance technique,  
appeler le: 1-877 273 3433)  
Roche Diagnostics  
F-38240 Meylan  
Distributore in Italia:  
Roche Diagnostics SpA  
Piazza Durante 11  
I-20131 Milano  
Distribuidor em Portugal:  
Roche Farmacêutica Química, Lda  
P-2700 Amadora

ROCHE, AMPERASE, AMPLICOR, AMPLI LINK, COBAS, AMPLIPREP, TAQMAN e HIGH PURE são marcas da Roche.

Roche Response Center é uma marca de serviço da Roche.

Microsoft and Windows XP são marcas registradas ou marcas da Microsoft Corporation nos Estados Unidos e/ou outros países.

ProClin é uma marca da Rohm and Haas Company.

Versant® é uma marca da Bayer Corporation.

Copyright 2005, Roche Molecular Systems, Inc. Todos os direitos reservados.  
9/2005

04408772001-04



Roche Diagnostics GmbH  
D-68298 Mannheim



## ANEXO 2

### Folha de resultados da carga viral do VHB por PCR-RT do teste Cobas Ampliprep/Cobas TaqMan HBV

H.U.C.  
Serviço de Imunohemoterapia

Laboratório de  
Biologia Molecular

#### AMPLILINK® 3.2.2 Report: Rack Result

Rack ID	Date/Time		Batch ID	Comment			
U 004	12/31/2008 10:33 AM						
T	T #	Order/Lot Number	Sample ID	Test	Result	Flags	Date/Time
S	01	*0459499	0459499	HBMCAP48	Target Not Detected		12/31/2008 3:51:35 PM
S	02	*0459501	0459501	HBMCAP48	Target Not Detected		12/31/2008 3:51:35 PM
S	03	*0459502	0459502	HBMCAP48	Target Not Detected		12/31/2008 3:51:35 PM
S	04	*0459503	0459503	HBMCAP48	Target Not Detected		12/31/2008 3:51:35 PM
S	05	*0459504	0459504	HBMCAP48	Target Not Detected		12/31/2008 3:51:35 PM
S	06	*0459505	0459505	HBMCAP48	350 IU/mL		12/31/2008 3:51:35 PM
S	07	*0459506	0459506	HBMCAP48	Target Not Detected		12/31/2008 3:51:35 PM
S	08	*0459507	0459507	HBMCAP48	2365 IU/mL		12/31/2008 3:51:35 PM
S	09	*0459509	0459509	HBMCAP48	Target Not Detected		12/31/2008 3:51:35 PM
S	10	*0459510	0459510	HBMCAP48	18444 IU/mL		12/31/2008 3:51:35 PM
S	11	*0459511	0459511	HBMCAP48	Target Not Detected		12/31/2008 3:51:35 PM
S	12	*0459512	0459512	HBMCAP48	Target Not Detected		12/31/2008 3:51:35 PM
S	13	*0459513	0459513	HBMCAP48	37933 IU/mL		12/31/2008 3:51:35 PM
NC	22	*K0446400000		HBMCAP48	Target Not Detected		12/31/2008 3:51:35 PM
LPC	23	*K0446400000		HBMCAP48	298 IU/mL		12/31/2008 3:51:35 PM
HPC	24	*K0446400000		HBMCAP48	1137418 IU/mL		12/31/2008 3:51:35 PM

### ANEXO 3

#### Folha pormenorizada do resultado de uma amostra (com visualização da curva de amplificação) por PCR-RT do teste Cobas Ampliprep/Cobas TaqMan HBV

H.U.C.  
Serviço de Imunohemoterapia

Laboratório de  
Biologia Molecular

##### AMPLILINK® 3.2.2 Report: Sample Result Detail

###### Order

Order Number: 0460873  
Order Date/Time: 1/23/2009 9:52:02 AM  
Sample ID: 0460873

###### Patient

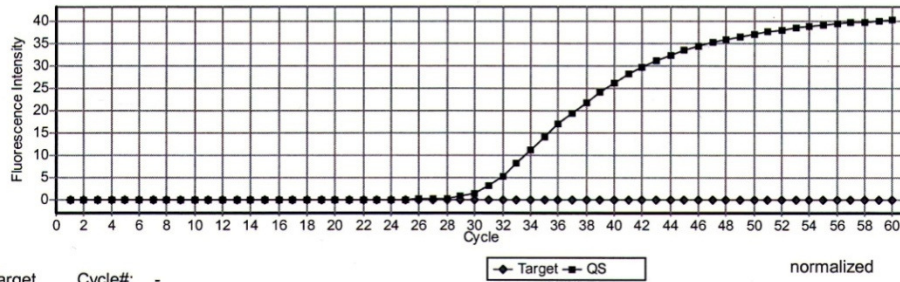
Patient ID:  
Date of Birth:  
Sex:

Test	Result	Flags	Date/Time
HBMCAP48	Target Not Detected		1/23/2009 2:17:39 PM

###### Workflow

Process Steps	Name	System ID	Position	Date/Time
✓ AmpliPrep Preparation	HBMCAP48	392143	001 - 10	1/23/2009 11:07:10 AM
✓ TaqMan48 Amplification	HBMCAP48	2292	TCA 001 - 14	1/23/2009 2:17:36 PM
✓ TaqMan48 Detection	HBMCAP48	2292	TCA 001 - 14	1/23/2009 2:17:39 PM

###### Measurement Details



Target Cycle#: -  
QS Cycle#: 28.5

###### Reagent Kits

Reagent Kit	Lot Number	Cassette Serial Nr.	Expiration Date	Calibration
PCR Kit	K0904400000	1515	8/31/2009	A: -0.0053, B: 0.3360, C: 3.7300

###### Detail Flags

TM71: \_S\_RFIT00LOW

###### Acceptance Information

Accepted by AM

Accepted Date/Time: 1/23/2009 2:41:23 PM

#### ANEXO 4

**Folha de dados Excel com Resultados obtidos (UI/ml) das cargas virais do plasma e do soro conjugados com outros dados: Sexo, Ano de Nascimento, Idade e HCV/HIV. As cargas virais estão divididas por grupos de logs, diferenciados pelas cores.**

Nº Amostra	PCR-PLASMA	PCR-SORO	SEXO	ANO	IDADE	VHC	VIH
460446	0	0	M	1937	72	P	P
466375	0	0	M	1937	72	P	P
455374	0	0	M	1956	53	P	P
466457	0	0	M	1947	62	P	N
466513	0	0	M	1947	62	P	N
459502	0	6	F	1950	59	P	N
466109	0	0	F	1954	55	P	N
460159	0	0	M	1973	36	P	N
466092	0	0	M	1973	36	P	N
466014	0	0	M	1977	32	P	N
460748	0	6	M	1940	69	N	P
466374	0	0	M	1945	64	N	P
460727	0	6	M	1938	71	N	N
460743	0	6	M	1938	71	N	N
460393	0	0	M	1938	71	N	N
460728	0	6	M	1939	70	N	N
459948	0	6	M	1940	69	N	N
460730	0	6	M	1940	69	N	N
463540	0	6	F	1941	68	N	N
460729	0	6	M	1941	68	N	N
456666	0	6	F	1942	67	N	N
459504	0	6	M	1942	67	N	N
463135	0	6	M	1942	67	N	N
466015	0	0	M	1942	67	N	N
465204	0	6	M	1943	66	N	N
459511	0	6	M	1944	65	N	N
458384	0	6	F	1945	64	N	N
462313	0	6	F	1945	64	N	N
459503	0	6	M	1945	64	N	N
462902	0	6	M	1945	64	N	N
463242	0	6	M	1945	64	N	N
456054	0	6	M	1946	63	N	N
459506	0	6	M	1946	63	N	N
461831	0	6	M	1946	63	N	N
459499	0	6	M	1947	62	N	N
460745	0	6	M	1947	62	N	N
460747	0	6	F	1948	61	N	N
460777	0	6	M	1948	61	N	N
459512	0	6	M	1949	60	N	N
464159	0	6	M	1949	60	N	N
460746	0	6	M	1950	59	N	N
459257	0	6	M	1951	58	N	N
460775	0	6	F	1952	57	N	N

461995	0	6	F	1952	57	N	N
464949	0	6	F	1952	57	N	N
459338	0	6	M	1953	56	N	N
460750	0	6	M	1953	56	N	N
465850	0	0	F	1958	51	N	N
458981	0	0	M	1958	51	N	N
466139	0	0	F	1959	50	N	N
460157	0	0	M	1977	32	N	N
459468	0	6	M	1984	25	N	N
461832	0	6	M	1984	25	N	N
465183	0	6	M	1984	25	N	N
460158	0	0	F	1984	25	N	N
459956	0	6	M	1989	20	N	N
465967	0	0	M	1947	62	N	N
458586	0	0	M	1959	60	N	N
465911	0	0	M	1981	28	N	N
466038	0	0	M	1960	49	N	N
455881	0	0	F	1968	41	N	N
456033	6	6	M	1960	49	N	P
460732	6	6	M	1930	79	N	N
462419	6	6	M	1931	78	N	N
459061	6	6	M	1933	76	N	N
465678	6	6	F	1935	74	N	N
463240	6	6	M	1935	74	N	N
456136	6	6	M	1938	71	N	N
463241	6	6	M	1941	68	N	N
466013	6	0	M	1943	66	N	N
456618	6	6	F	1944	65	N	N
460744	6	6	M	1944	65	N	N
457157	6	6	F	1945	64	N	N
458757	6	0	M	1945	64	N	N
458758	6	0	M	1945	64	N	N
456263	6	6	M	1947	62	N	N
464195	6	6	F	1948	61	N	N
460161	6	6	M	1949	60	N	N
462721	6	6	M	1949	60	N	N
456471	6	6	M	1950	59	N	N
459426	6	6	M	1950	59	N	N
463001	6	6	M	1950	59	N	N
459796	6	6	M	1951	58	N	N
463273	6	6	M	1951	58	N	N
464977	6	6	M	1951	58	N	N
465527	6	6	M	1952	57	N	N
466482	6	6	M	1953	56	N	N
465993	6	0	M	1955	54	N	N
459717	6	6	F	1957	52	N	N
456135	6	6	M	1960	49	N	N
456751	6	6	M	1960	49	N	N
459397	6	6	M	1960	49	N	N
461802	6	6	M	1960	49	N	N

462556	6	6	M	1960	49	N	N
459775	6	6	F	1961	48	N	N
466294	6	6	F	1961	48	N	N
464629	6	6	M	1961	48	N	N
465716	6	6	M	1961	48	N	N
458639	6	6	M	1962	47	N	N
462378	6	6	M	1962	47	N	N
461861	6	6	M	1965	44	N	N
465584	6	0	M	1965	44	N	N
459593	6	6	F	1966	43	N	N
462048	6	6	F	1966	43	N	N
466487	6	6	F	1966	43	N	N
462776	6	6	M	1966	43	N	N
462777	6	6	F	1967	42	N	N
455862	6	6	M	1969	40	N	N
463617	6	6	M	1969	40	N	N
461302	6	6	M	1970	39	N	N
462092	6	6	M	1970	39	N	N
463358	6	6	M	1970	39	N	N
458218	6	6	M	1972	37	N	N
459803	6	6	M	1972	37	N	N
459909	6	6	M	1973	36	N	N
462039	6	6	M	1974	35	N	N
465948	6	6	M	1974	35	N	N
458305	6	6	M	1975	34	N	N
458553	6	6	M	1975	34	N	N
455618	6	6	M	1978	31	N	N
460643	6	6	M	1978	31	N	N
459160	6	6	F	1979	30	N	N
465455	6	6	F	1979	30	N	N
455912	6	6	M	1979	30	N	N
461303	6	6	M	1979	30	N	N
462613	6	6	M	1979	30	N	N
465058	6	0	M	1979	30	N	N
465153	6	6	F	1980	29	N	N
458424	6	6	M	1988	21	N	N
459705	6	6	M	1992	17	N	N
458664	6	6	M	1965	44	N	N
459907	6	6	M	1965	44	N	N
462801	6	6	M	1956	53	N	N
460468	12	17	F	1958	51	N	N
456250	13	6	M	1975	34	N	N
456772	14	6	M	1971	38	N	N
459425	15	25	M	1939	70	N	N
464832	15	6	M	1966	43	N	N
459331	16	6	M	1988	21	N	N
463266	21	6	F	1947	62	N	N
463506	22	6	M	1955	54	N	N
466269	28	6	M	1971	38	N	N
465040	29	6	M	1939	70	N	N

462691	29	6	M	1969	40	N	N
456252	30	37	F	1957	52	N	N
456200	34	31	F	1964	45	N	N
464161	35	6	M	1963	46	N	N
465761	43	6	F	1963	46	N	N
465528	47	44	M	1961	48	N	N
458602	48	27	M	1938	71	N	N
455923	51	18	M	1956	53	N	N
465233	56	45	M	1964	45	N	N
456430	57	40	M	1963	46	N	N
462494	66	6	F	1989	20	N	N
466346	73	76	F	1941	68	N	N
466284	74	74	M	1945	64	N	N
465907	80	6	M	1955	54	N	N
458774	86	65	F	1955	54	N	N
462037	90	42	M	1966	43	N	N
459303	92	47	F	1976	33	N	N
465912	94	69	F	1974	35	N	N
457422	114	153	F	1964	45	N	N
460443	117	181	M	1966	43	N	N
456360	120	55	M	1949	60	N	N
457398	125	81	M	1953	56	N	N
457636	126	92	F	1934	75	N	N
466438	127	169	M	1950	59	N	N
457532	130	168	M	1950	59	N	N
460469	131	189	F	1963	46	N	N
465454	135	59	M	1979	30	N	N
459039	136	35	F	1950	59	N	N
457253	140	182	M	1961	48	N	N
458219	141	136	F	1940	69	N	N
461905	141	26	M	1970	39	N	N
464296	144	58	M	1963	46	N	N
464081	144	146	M	1989	20	N	N
460058	148	97	M	1963	46	N	N
459101	160	159	M	1975	34	N	N
456201	172	188	F	1959	50	N	N
466090	178	163	M	1954	55	N	N
463378	180	165	M	1980	29	N	N
456942	192	177	M	1968	41	N	N
460642	194	299	F	1974	35	N	N
458851	197	344	F	1939	70	N	N
457397	201	291	M	1973	36	N	N
465992	205	126	M	1956	53	N	N
465973	216	176	F	1984	25	N	N
455885	219	265	F	1982	27	N	N
459908	222	72	F	1948	61	N	N
462807	225	123	M	1982	27	N	N
456457	237	319	F	1984	25	N	N
466112	245	67	M	1971	38	N	N
457014	254	154	M	1962	47	N	N



464680	260	173	M	1951	58	N	N
457401	261	226	M	1963	46	N	N
462577	265	141	M	1984	25	N	N
457314	279	259	F	1954	55	N	N
460045	279	148	M	1959	50	N	N
460908	293	323	F	1970	39	N	N
458663	296	349	F	1934	75	N	N
456835	300	355	M	1966	43	N	N
459149	300	278	M	1968	41	N	N
456117	302	286	F	1960	49	N	N
455952	319	361	F	1957	52	N	N
464314	327	167	M	1959	50	N	N
464260	327	246	M	1960	49	N	N
464108	345	205	F	1956	53	N	N
456749	348	365	F	1953	56	N	N
456834	351	411	M	1959	50	N	N
459505	355	350	F	1950	59	N	N
459224	356	284	M	1959	50	N	N
463694	360	252	F	1961	48	N	N
464157	366	357	M	1979	30	N	N
457421	374	318	F	1966	43	N	N
458988	390	459	M	1945	64	N	N
456051	401	426	F	1970	39	N	N
455497	406	439	M	1959	50	N	N
456667	427	491	F	1966	43	N	N
455792	444	605	M	1971	38	N	N
464156	465	548	M	1972	37	N	N
457155	494	635	F	1956	53	N	N
462224	498	542	F	1954	55	N	N
458585	500	424	F	1936	73	N	N
455828	552	360	M	1974	35	N	N
455717	580	524	F	1955	54	N	N
456963	598	635	F	1984	25	N	N
456980	617	682	F	1958	51	N	N
457050	648	496	M	1950	59	N	N
464515	657	916	F	1983	26	N	N
459109	724	709	M	1957	52	N	N
465077	776	547	F	1982	27	N	N
459899	821	1021	F	1980	29	N	N
456182	837	943	M	1965	44	N	N
466469	876	1105	F	1949	60	N	N
464616	915	757	F	1961	48	N	N
462722	940	1182	F	1948	61	N	N
456203	954	897	M	1968	41	N	N
465481	968	986	F	1954	55	N	N
456052	1083	1081	F	1953	56	N	N
456773	1103	1065	M	1972	37	N	N
466110	1152	1088	M	1957	52	N	N
463274	1169	1113	M	1963	46	N	N
460082	1174	1078	M	1956	53	N	N

466216	1192	1763	F	1966	43	N	N
460070	1198	1586	F	1947	62	N	N
457128	1321	1430	M	1940	69	N	N
459444	1333	1428	M	1988	21	N	N
457764	1347	838	M	1975	34	N	N
463353	1397	1385	M	1970	39	N	N
459841	1448	956	M	1970	39	N	N
461940	1495	1199	M	1989	20	N	N
455561	1499	1430	M	1955	54	N	N
462470	1504	1478	M	1965	44	N	N
462005	1602	1687	F	1945	64	N	N
458444	1647	1615	F	1970	39	N	N
459675	1775	1339	M	1979	30	N	N
460083	1790	1699	M	1960	49	N	N
463332	1819	1692	M	1960	49	N	N
462522	1903	1973	F	1982	27	N	N
464258	1990	1738	M	1956	53	N	N
457018	1996	2148	F	1960	49	N	N
464259	2053	1972	F	1962	47	N	N
462417	2089	1600	F	1935	74	N	N
460346	2138	2124	M	1967	42	N	N
459147	2185	1232	M	1982	27	N	N
461174	2300	2123	M	1986	23	N	N
457004	2322	2108	M	1975	34	N	N
461617	2460	1148	M	1972	37	N	N
459898	2486	3060	M	1941	68	N	N
465059	2529	2198	F	1968	41	N	N
459507	2604	2365	F	1968	41	N	N
460332	2619	2542	M	1961	48	N	N
458894	2704	1517	F	1990	19	N	N
456837	2714	2257	M	1979	30	N	N
459714	2735	3616	F	1975	34	N	N
461312	2907	2089	F	1968	41	N	N
456410	2907	1715	M	1974	35	N	N
455710	2973	3293	M	1980	29	N	N
458668	3203	4126	F	1950	59	N	N
463975	3258	3650	M	1956	53	N	N
456793	3362	3138	M	1963	46	N	N
463626	3419	2040	F	1958	51	N	N
464430	3562	3570	F	1963	46	N	N
459897	3657	7200	F	1949	60	N	N
462562	3733	2655	F	1948	61	N	N
458935	3780	2472	F	1954	55	N	N
458660	4217	3409	M	1959	50	N	N
465731	4219	5374	M	1970	39	N	N
462775	4424	4964	M	1971	38	N	N
461712	5156	5647	M	1958	51	N	N
458896	5270	4720	M	1943	66	N	N
457313	5351	5638	M	1969	40	N	N
465991	5606	4171	M	1958	51	N	N

458661	5647	3755	M	1958	51	N	N
465443	5674	4996	F	1980	29	N	N
461611	6120	3052	M	1963	46	N	N
464472	6211	3565	F	1947	62	N	N
459985	6668	4736	M	1975	34	N	N
466089	7027	6685	M	1932	77	N	N
459330	7551	5428	M	1958	51	N	N
462306	7689	6926	F	1985	24	N	N
465508	7940	6185	M	1974	35	N	N
464429	8442	8274	M	1978	31	N	N
457049	9392	7770	F	1969	40	N	N
466091	9407	7620	F	1966	43	N	N
459148	9770	8308	M	1978	31	N	N
462471	10889	10042	M	1975	34	N	N
460863	10966	13261	M	1970	39	N	N
462561	11627	9188	M	1950	59	N	N
460356	12545	12224	M	1967	42	N	N
463836	13272	11953	M	1977	32	N	N
456426	16378	17098	M	1983	26	N	N
459308	17170	17776	M	1969	40	N	N
464594	17205	12346	F	1960	49	N	N
457432	17478	14409	M	1978	31	N	N
466395	18785	14643	M	1956	53	N	N
465780	20129	22406	F	1963	46	N	N
459802	20525	13834	M	1970	39	N	N
459594	20792	23466	M	1961	48	N	N
456361	21768	16109	F	1954	55	N	N
460353	22687	24618	M	1947	62	N	N
456978	22874	21923	M	1962	47	N	N
459510	23472	18444	M	1974	35	N	N
465236	25119	18554	M	1970	39	N	N
463372	27003	20191	F	1988	21	N	N
457417	27537	28693	M	1951	58	N	N
464849	27587	17496	M	1956	53	N	N
462312	27689	24626	M	1947	62	N	N
456750	29487	35048	F	1945	64	N	N
465800	29850	29388	F	1949	60	N	N
455793	37857	36937	M	1979	30	N	N
461480	40759	38191	M	1975	34	N	N
465995	45827	34475	M	1941	68	N	N
460445	46990	47101	M	1963	46	N	N
466214	47186	38646	M	1968	41	N	N
460069	49775	37794	M	1943	66	N	N
455884	57714	74200	M	1978	31	N	N
466471	73687	61586	M	1966	43	N	N
462307	74057	63371	M	1970	39	N	N
456752	104452	146632	M	1941	68	N	N
459040	121615	110260	M	1958	51	N	N
456248	125675	113593	F	1974	35	N	N
461633	156884	147662	M	1960	49	N	N

463186	159686	117863	M	1963	46	N	N
464055	178763	359262	F	1970	39	N	N
466111	216665	408108	M	1970	39	N	N
459718	264808	454687	M	1962	47	N	N
464160	323357	375979	F	1964	45	N	N
460243	328513	354366	M	1970	39	N	N
465969	463939	375972	M	1964	45	N	N
463052	590880	699336	M	1982	27	N	N
460882	1705936	2355041	M	1960	49	N	N
461172	2740140	9356940	F	1949	60	N	N
463431	2742787	10061923	M	1953	56	N	N
458640	3719996	19192382	M	1950	59	N	N
459930	4273700	8343568	M	1933	76	N	N
465714	110000000	26324420	M	1951	58	N	N
465665	110000000	87274960	M	1964	45	N	N
463355	881456000	206338180	M	1956	53	N	N
464613	990751700	906950500	F	1990	19	N	N

## ANEXO 4

### Resultados das réplicas de soro

			DILUIÇÃO
Nº Amostra	SORO	SORO	SORO 1/2
459841	956	-	992
459039	0	-	70
462037	13	-	42
450376	353	-	298
450361	15	-	<12
451610	44497	-	48000
452255	221	-	166
452344	23	21	-
452451	426	411	-
452485	697	-	550
453151	100	133	-
454053	44	29	-
454269	13	14	-
454678	132	-	96
454679	30	-	<12
456851	<12	-	<12
457542	17	-	28
457815	701	-	418
458219	136	141	-
460468	17	-	<12
462037	13	-	42
462855	75	-	28
465775	65	-	202
466742	23	-	28
468941	50	36	-
469033	38	42	-